

**IN VIVO ÜBERLEBENSZEIT UND ORGANAUFNAHME
MAKROMOLEKÜLBELADENER TRÄGERERYTHROZYTEN
BEI MÄUSEN**

Wilhelm Schrot
1982

Diss München

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand : Professor Dr. N. Zöllner

IN VIVO ÜBERLEBENSZEIT UND ORGANAUFNAHME MAKROMOLEKÜLBELADENER
TRÄGERERYTHROZYTEN BEI MÄUSEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Schrot

Wittlich

1982

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter : Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.1982

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Material	7
2.2 Blutentnahme	7
2.3 Präparation von Trägererythrozyten	8
2.4 I.v.-Injektion 125-I PVP beladener Träger- erythrozyten	9
2.5 Blutentnahme nach Injektion, Organentnahmen	10
2.6 Rechnerische Verarbeitung der gemessenen Daten	11
2.7 Splenektomie	14
2.8 Versuchsbeschreibungen	20
2.9 Osmotische Resistenz	24
3. ERGEBNISSE	26
3.1 Gesamtblutvolumen und Organblutvolumina	26
3.2 Einschluß von radioaktiv markiertem PVP in Trägererythrozyten	27
3.3 Splenektomie	28
3.4 I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung	29
3.5 I.v.-Injektion 125-I PVP beladener mensch- licher Trägererythrozyten in Mäuse	30
3.6 I.v.-Injektion 125-I PVP beladener Mäuse- trägererythrozyten in Mäuse	31
3.7 Osmotische Resistenz	36
4. DISKUSSION	38
5. ZUSAMMENFASSUNG	59
6. TABELLEN	61
7. ABBILDUNGEN	81
8. LITERATURVERZEICHNIS	104
9. ANHANG	112

1. EINLEITUNG

Große Fortschritte in der Kenntniss pathophysiologischer und genetischer Ursachen und der diagnostischen Möglichkeiten kennzeichnen die wissenschaftliche Entwicklung auf dem Gebiet der angeborenen Stoffwechselleiden in den vergangenen Jahrzehnten (STANBURY 1978). Es ist bekannt, daß die Rotation in der DNA-Sequenz das Fehlen eines Enzymes oder die Produktion eines Enzymes nicht ausreichender Funktion nach sich zieht (BROCK et al. 1972). Trotz erheblicher wissenschaftlicher Bemühungen ist die klinische Behandlung angeborener Stoffwechselleiden mit Enzymdefekten bislang unbefriedigend geblieben. In vielen Fällen ist eine therapeutische Beeinflussung überhaupt nicht möglich, in anderen Fällen muß sie sich auf symptomatische Maßnahmen oder auf die verminderte Zufuhr des toxisch angehäuften Substrates beschränken. Die therapeutische Beeinflussung auf der Stufe des primären genetischen Defektes ist gegenwärtig nicht möglich. Therapeutische Maßnahmen auf der Stufe des primären metabolischen Defektes, des spezifischen Enzymmangels sind jedoch untersucht (SCRIVER 1973). Die Applikation des fehlenden Enzymes wurde zunächst für lysosomale Speicherkrankheiten vorgeschlagen. Als Grundlage diente die Hypothese, daß exogen zugeführte Enzyme nach Endozytose mit den Lysosomen zum Abbau der pathologisch erhöhten Substrate führten (IHLER 1973). Die kurze Überlebenszeit, bedingt durch rasche Inaktivierung oder renale Ausscheidung, und die teils dramatischen immunologischen Reaktionen bei freier intravenöser Verabreichung von Enzymen, verbieten jedoch diese Art von Enzymsubstitutionstherapie in

der klinischen Praxis. Zahlreiche Untersuchungen arbeiten daraufhin, Enzyme durch mannigfaltige Techniken zu immobilisieren und somit vor raschem Abbau oder Inaktivierung zu schützen (DESNICK et al. 1976). So wurde die Anwendung einer Vielzahl natürlicher oder synthetischer Polymere, kovalenter Bindungen oder der Einschluß von Enzymen in solche Substanzen untersucht. Die Entwicklung kleinster, synthetischer, artefizieller Zellen, welche hervorragende Eigenschaften im extrakorporealen Kreislauf zeigten, erlaubte den Einschluß wasserlöslicher Enzyme (CHANG 1975). Enormes wissenschaftliches Interesse hat die Verwendung von Liposomen als zelluläre Trägersubstanzen auf sich gezogen (GREGORIADIS 1979). So konnte im Tierexperiment dargestellt werden, daß Liposomen als Transportsystem für Enzyme vom Ort der Verabreichung bis zur Aufnahme in der Leber verwendet werden können. Für den Abbau von Substraten im Plasma können Liposomen jedoch nicht verwendet werden, da die toxisch angehäuften Substrate die Membran nicht passieren können.

Die Verwendung von Erythrozyten-Schatten ("erythrocyte-ghosts") als abbaubare Trägersysteme für exogene Enzyme in der Behandlung angeborener Stoffwechselkrankheiten wurde von Ihler et al. vorgeschlagen (IHLER et al. 1973). Das vorgeschlagene Einschlußverfahren war das der reversiblen direkten Hämolyse, das auf dem Einschluß der Enzyme in nahezu hämoglobinfreie Erythrozytenmembranhüllen beruhte. Von ähnlichen Zellen geht ein Verfahren des dielektrischen Durchbruchs aus, das unter isoosmotischen Bedingungen den Einschluß therapeutisch wirksamer Substanzen erlaubt (ZIMMERMANN 1973). Durch

vergleichende methodische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß eine Methode der reversiblen hypotonen Hämolyse den höchsten Prozentsatz des Einschlusses der zugefügten Enzyme erlaubt (SPRANDEL et al. 1979 a). Darüber hinaus handelte es sich bei dieser Methode um Zellen, deren Zellinhalt, Morphologie und Membrantransporteigenschaften denen normaler Erythrozyten vergleichbar sind (SPRANDEL et al. 1979 b, SPRANDEL et al. 1979 c, HUBBARD et al. 1979 a, HUBBARD et al. 1980 a). Die Methode der reversiblen hypotonen Hämolyse erlaubte den Einschluß von zirka 40 Prozent der zugefügten Proteine, wogegen mit der Methode des dielektrischen Durchbruchverfahrens lediglich 3 Prozent zum Einschluß kamen (SPRANDEL et al. 1981 a, CHALMERS et al. 1981). Makromolekülbeladene Erythrozyten, die durch das hypoosmotische Dialyseverfahren hergestellt wurden, zeigten im Hund die gleiche in-vivo Überlebenszeit wie normale Erythrozyten (SPRANDEL et al. 1980 c, SPRANDEL et al. 1981 c). Da sich diese Zellen weder im in vivo Verhalten, noch in Zellinhalt, in den Transportmembraneigenschaften und der Morphologie von normalen Erythrozyten unterscheiden, und darüber hinaus noch in der Lage sind, exogene Moleküle zu befördern, wurde der Begriff Trägererythrozyten (SPRANDEL et al. 1980 a), bzw. "carrier erythrocytes" (SPRANDEL et al. 1980 c) für diese Zellen vorgeschlagen. Andere Autoren haben mittlerweile diesen Begriff ebenfalls übernommen (DELOACH and BARTON 1980). Damit ist eine eindeutige Abgrenzung zu den herkömmlichen leeren Membranhüllen der Erythrozytenschatten ("erythrocyte-ghosts") möglich.

Die Anwendung der Trägererythrozyten als Trägersysteme für Enzyme in der Behandlung von angeborenen Stoffwechselleiden erfordert die gründliche Untersuchung dieses Systems zunächst im Tiermodell. Umfangreiche Untersuchungen *in vitro* haben erhebliche Speziesunterschiede ergeben (SPRANDEL et al. 1981 b). So ist die Präparation von Erythrozytenschatten bei Ratten unter allen gewählten Versuchsbedingungen nicht möglich gewesen, da es stets zu Kristallbildungen kam, was rasterelektronenmikroskopisch belegbar war (SPRANDEL et al. 1981 b). Erythrozytenschatten von Meerschweinchen mußten für *in vivo* Untersuchungen ausscheiden, da sie sich bereits *in vitro* als so instabil erwiesen, daß insgesamt nur 3 Prozent der zugefügten Makromoleküle zum Einschluß kamen (SPRANDEL et al. 1981 b). Einen wesentlich höheren Einschluß von über 20 Prozent zeigten Erythrozytenschatten von Kaninchen. Diese Zellen, die rasterelektronenmikroskopisch als Echinozyten erschienen, wiesen jedoch *in vivo* einen raschen initialen Abbau auf (SPRANDEL 1980 b, SPRANDEL 1981 b). Eine gleichfalls verkürzte Überlebenszeit *in vivo* zeigten Zellen von Mäusen. Ursache war der erhebliche Verlust von zellulärem ATP, da nachgewiesen werden konnte, daß Regeneration von zellulärem ATP zu einer deutlichen Verlängerung der *in vivo* Überlebenszeit von Erythrozytenschatten bei Mäusen führte, obwohl diese im Vergleich zu normalen Mäuseerythrozyten noch deutlich kürzer war (HUBBARD et al. 1980 b). Normale zelluläre ATP-Spiegel der Erythrozytenschatten konnten mit Zellen von Hunden erzielt werden, deren *in vivo* Überlebenszeit der Überlebenszeit normaler Erythrozyten entsprach (SPRANDEL et al. 1980 c, SPRANDEL et al. 1981 c). Da auch *in vitro* die

Erythrozyten von Hunden den menschlichen Erythrozyten am ähnlichsten waren, muß der Hund als das Versuchstier der Wahl für zukünftige Versuche auf diesem Gebiet gelten (SPRANDEL et al. 1980 c). Für die Vielzahl von Untersuchungen, wie zum Beispiel Organuntersuchungen, Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit und zur Toxizität sind jedoch kleine, in großer Anzahl zu Verfügung stehende Laboratoriumstiere erforderlich. Unter diesen zu Verfügung stehenden Spezies hat sich eindeutig die Maus als das ideale Versuchstier erwiesen.

Die Verwendung biologisch abbaubarer zellulärer Trägersysteme für Enzyme bietet sich für zwei grundsätzlich verschiedene Situationen der Enzyersatztherapie bei angeborenen Stoffwechselleiden an (SPRANDEL et al. 1979 c). Der Abbau toxisch erhöhter Substrate erfordert die optimal lange Zirkulation des zum Abbau befähigten exogenen Enzyms, das in das Trägersystem eingeschlossen ist, und dort das toxisch erhöhte Substrat in ein Produkt umwandelt, welches im Organismus weiter abgebaut werden kann. Dieses System, das von SPRANDEL et al. am Beispiel erhöhter Phenylalaninspiegel bei Phenylketonurie vorgeschlagen wurde (SPRANDEL et al. 1979 c), erfordert jeweils den raschen und ausreichenden Transport des betreffenden Substrates über die Erythrozytenmembran und den gleich raschen oder rascheren Transport des Produktes aus dem Trägersystem heraus (SPRANDEL et al. 1979 c). Die Effektivität dieser Voraussetzung wurde am Beispiel des Phenylalanins, der Harnsäure und mehrerer organischer Säuren bereits dargestellt (SPRANDEL et al. 1979 b, SPRANDEL et al. 1979 c, HUBBARD et al. 1980 a). Eine weitere Voraussetzung für diese Situation ist

die optimale Überlebenszeit des Trägersystems. Bei Untersuchungen mit Hunden konnten hier unter Einhaltung optimaler Bedingungen normalen Erythrozyten entsprechende Überlebenszeiten erreicht werden (SPRANDEL et al. 1980 c, SPRANDEL et al. 1981 c) Die zweite wesentliche Situation in der Enzymbehandlung angeborener Stoffwechselleiden mit Enzymmangel betrifft Stoffwechseldefekte lysosomaler Enzyme.

Voraussetzung für das therapeutische Prinzip der enzymbeladenen Trägererythrozyten ist es, das fehlende Enzym zum Zielorgan Leber und den Lysosomen zu dirigieren. Die vorliegende Arbeit hat es sich daher zur Aufgabe gemacht, das Schicksal eingeschlossener Makromoleküle in vivo zu verfolgen und ihre Aufnahme in die verschiedenen Organe zu erfassen. Darüber hinaus sollte der Versuch unternommen werden, die eingeschlossenen Makromoleküle vermehrt der Leber, dem Zielorgan der fehlenden Enzyme zuzuführen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Die Versuche wurden an Albinomäusen der Zuchtstämme NMRI (Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen) und BALB/c (Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover) vorgenommen. Bei NMRI-Mäusen handelt es sich um die Koloniezucht (closed colony) eines Stammes. Das durchschnittliche Körpergewicht eines annähernd ausgewachsenen, 40 Tage alten männlichen Tieres beträgt etwa 28 g (Mitteilungsblatt der Süddeutschen Versuchstierfarm). Die hier verwendeten männlichen Mäuse entsprachen weitgehend dieser Angabe. BALB/c-Mäuse weisen die Eigenschaften eines reinen Inzuchtstammes auf. Das durchschnittliche Gewicht ausgewachsener Tiere liegt je nach Geschlecht zwischen 22 und 26 g (Mitteilungsblatt des Zentralinstituts für Versuchstiere). Zur Untersuchung kamen Mäuse sowohl weiblichen als auch männlichen Geschlechts unterschiedlichen Lebensalters. Geschlecht sowie Alters- und Gewichtsverteilung sind den einzelnen Versuchreihen zugeordneten Tabellen zu entnehmen. Die Mäuse wurden in herkömmlichen Käfigen in Gruppen zu je 15- 20 Tieren gehalten, wobei standardisiertes Mäusefutter und Trinkwasser ad libitum zu Verfügung gestellt wurden.

2.2 Blutentnahme

Vor Blutentnahme erwies sich eine subcutane Heparin-gabe von ca. 20 u1 (5000 U.S.P.-E. pro ml, Thrombophob R, Nordmark-Werke Hamburg) als vorteilhaft, um der ansonsten sehr rasch

ablaufenden Blutgerinnung entgegenzuwirken. Bei Verwendung heparinbeschichteter Blutentnahmeröhrchen kam es hingegen in wiederholten Fällen zur Agglutination. Die Blutentnahme selbst erfolgte in Äther-Inhalationsnarkose. Hierzu wurden die Tiere in ein verschließbares Glasgefäß eingebracht, das mit Äther getränkten Zellstoff enthielt. Nach Erreichen eines genügend tiefen Narkosestadiums wurde der auf dem Rücken liegenden Maus durch perkutanen Eingang über das Jugulum eine 1-er Kanüle in die Herzgegend placiert, und von dort über die Vena Cava Superior oder eine der Herzkammern Blut in eine Spritze abgezogen. So wurde jeweils versucht die maximale Blutmenge abzupunktieren, wobei die Mäuse im hypovolämischen Schock ad exitum kamen. Pro Maus konnten auf diese Weise in der Regel zwischen 0,5 und 1,2 ml Blut gewonnen werden, im Mittel waren es etwa 0,8 ml. Das Blut mehrerer Mäuse wurde in einem Gefäß gesammelt, bis die zur Herstellung von Erythrozytenschatten erforderliche Menge von ca. 4-5 ml Blut erreicht war.

2.3 Präparation von Trägererythrozyten

Nach Blutentnahme wurden die Erythrozyten in Puffer I (150 mM NaCl, 5 mM K₂HPO₄, pH 7,4) 3 mal je 10 Minuten bei 4 Grad Celsius und 500 x g (1600 U/min) in der Zentrifuge ROTO SILENTA/K (Hettich, Tuttlingen) gewaschen. Nach jedem einzelnen Waschgang wurde der Überstand verworfen und dem Sediment erneut Puffer I zugesetzt. Nach dem letzten Waschgang wurden die zellulären Bestandteile zusammen mit cirka 1 ml Puffer I und, je nach Versuchsanordnung, 125 I-Polyvinylpyrrolidon (125-I PVP, Amersham Buchler, Braunschweig), der einzu-

schließenden Substanz, in ein Dialysesäckchen (THOMAPOR-Dialysierschläuche, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) eingefüllt. Die 60-minütige Dialyse gegen hypoosmolaren Puffer II (5 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 7.4) erfolgte bei 4 Grad Celsius unter ständiger Rotation (REAG-Glas ROTATOR, Cenco Deutschland). Nach Austausch des hypoosmolaren Puffers II gegen isoosmolaren Puffer I wurde 30 Minuten bei 37 Grad Celsius im Brutschrank rotiert und anschließend der Inhalt des Dialysesäckchens in einem Zentrifugenröhrchen mit Puffer A (145 mM NaCl, 5 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 5 mM Glucose, 5 mM Adenosin, 4 mM Magnesium-Chlorid) 60 Minuten lang inkubiert. Im Anschluß an den Inkubationsvorgang wurde das gewonnene Material 2 mal 20 Minuten bei 4 Grad Celsius und 500 x g gewaschen. Nach dem ersten Waschgang wurde der Überstand verworfen und erneut Puffer I zugegeben. Die Herstellung der Trägererythrozyten war mit der Entfernung des Überstandes des zweiten Waschganges beendet.

2.4 I.v.-Injektion ^{125}I PVP beladener Trägererythrozyten

Die mit ^{125}I Polyvinylpyrrolidon beladenen Erythrozytenschatten wurden im Volumenverhältnis 2:1 in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und in eine graduierte Tuberkulinspritze aufgezogen. Gleichzeitig wurde eine geringe Menge Heparin (ca. 40 μ l) zugegeben, wodurch die subcutane Heparin-injektion bei am gleichen Tage durchzuführender Blutentnahme entfallen konnte. Vor Injektion wurde das Gesamtgewicht der Spritze auf einer elektronischen Präzisionswaage bestimmt (Präzisionswaage 1212 MP, Sartorius Göttingen). Zur Gewähr-

leistung eines sicheren Injektionsvorganges wurde die Maus vor Injektion in eine Halterung eingebracht. Zu diesem Zwecke diente eine 50 ml Spritze, die an einer Längsseite aufgeschnitten wurde, und an deren Ende nach Einbringen des Tieres lediglich der Schwanz herausragte. Durch vorsichtiges Nachführen des Stempels konnten die Versuchstiere soweit eingengt werden, daß größere und ruckartige Bewegungen der unmöglich wurden. In der Regel waren die lateral gelegenen Schwanzvenen gut ausfindig zu machen; vorteilhaft erwies sich eine Weitstellung der Venen, was sowohl durch Eintauchen des Schwanzes in ein warmes Wasserbad als auch durch Bestreichen der Injektionsstelle mit einem xylogetränktem Tupfer erreicht werden konnte. Zusätzlich wurden die Mäuse vor Versuchsbeginn unter Rotlicht erwärmt, was die Weitstellung der Gefäße ebenfalls günstig beeinflusste. Zur Unterdrückung von Schmerzreaktionen wurde kurz vor Injektion der Schwanz mit einem Lokalanästhetikum (Xylocain-Spray, ASTRA-Chemicals Wedel) besprüht. Nach Erwärmung der Spritze auf 37 Grad Celsius wurde über eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Die Bestimmung der injizierten Menge erfolgte durch Abwiegen der Spritze vor und nach Injektion auf der elektronischen Präzisionswaage:

$$\text{Injektionsmenge } x \text{ (g)} = G_0 - G_1$$

Zu jeder Versuchsreihe wurde eine Leerprobe zurückbehalten, deren Gewicht in gleicher Weise bestimmt wurde.

2.5 Blutentnahme nach Injektion, Organentnahmen

Nach Bestimmung des Gesamtkörpergewichtes des Versuchstieres erfolgte die Blutentnahme nach der oben beschriebenen Art und Weise (Methoden 2.2) in Äthernarkose. Zu den gegebenen Zeit-

punkten Tx (Tx = 0, 30, 180 Minuten, 24 Stunden etc.) wurde jeweils eine Maus verwandt. In Fällen, in denen die Injektion mehr als 4 Stunden zurücklag, erfolgte vorab eine subcutane Heparin-gabe. Unter Anwendung von Standardtechniken wurde das ad exitum gekommene Tier präpariert, wobei nach Eröffnung von Thorax und Abdomen die Organe Leber, Milz, Nieren und Herz, sowie in einzelnen Experimenten auch Lungen, Gehirn und Extremitäten entnommen wurden. Die Radioaktivität der Gesamtor-gane wurde in einem Gammazählgerät (Gammaszint 5300, Becht-hold, Wildbad) gemessen. Das durch Punktion gewonnene Blut wurde mittels einer Eppendorf-Zentrifuge (Typ 5414, Eppen-dorf-Gerätebau, Hamburg) in Erythrozyten und Plasma fraktio-niert und Aliquots von 100 µl im Gammazähler gemessen. Aus technischen Gründen war die Erfassung des Nullwertes erst nach ca. 1/2-1 Minute möglich.

2.6 Rechnerische Verarbeitung der gemessenen Daten

Aufgrund der unterschiedlichen Körper- und Organgewichte, sowie der unterschiedlichen Blutmengen der Organe war zu besseren Vergleichbarkeit eine rechnerische Aufarbeitung der gemessenen Werte erforderlich.

2.6.1 Bestimmung der Gesamtblutmenge (X) über die ¹²⁵I PVP Verdünnungsmethode.

Nach intravenöser Injektion einer definierten Menge ¹²⁵-I PVP Lösung wurde die Radioaktivität in 100 µl Blut nach Ausbluten der Versuchstiere bestimmt und mit der Radioaktivität der Leerprobe in Relation gesetzt.

a) Gesamtblutmenge (X):

$$X = \frac{C1}{Cb} * \frac{Do}{D1} * 100 \quad (ul)$$

C1 = Zählrate der Leerprobe
Cb = Zählrate in 100 ul Blut
D1 = Leermenge
Do = Injektionsmenge

b) Umrechnung in ul pro Gramm Körpergewicht (KG):

$$x = \frac{X}{K \text{ G}} \quad (ul/g)$$

2.6.2 Bestimmung des Blutgehaltes von Leber, Milz, Niere und Herz.

Diesen Berechnungen wurden sowohl die 125-I PVP Verdünnungsmethode, als auch das analoge Verfahren mit 125-I PVP beladenen Trägererythrozyten zugrunde gelegt. Im Anschluß an die unter 2.6.1 durchgeführten Bestimmungen wurden die einzelnen Organe präpariert, deren Radioaktivität gemessen und mit der in 100 ul Blut gemessenen Radioaktivität in Relation gesetzt. Zusätzlich wurden die Nullwerte der mit 125-I PVP beladenen Trägererythrozyten durchgeführten Versuchsreihen den Berechnungen hinzugezogen. Hier wurde in entsprechender Weise verfahren.

a) Gesamtblutmenge (X) eines Organes:

$$X = \frac{Cor}{Cb} * 100 \quad (ul)$$

Cor = Zählrate des Organs
Cb = Zählrate in 100 ul Blut

b) Umrechnung in ul Blut pro Gramm Organgewicht (OG):

$$x = \frac{X}{O \text{ G}} \quad (ul/g)$$

2.6.3 Bestimmung der effektiven Organanreicherung einer Testsubstanz (unter Berücksichtigung der Organblutmenge)

a) Berechnung der Absolutwerte:

Nach Bestimmung der durchschnittlichen organspezifischen Blutmenge und der Messung der zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten in Blut und Organen vorhandenen Radioaktivitäten, erfolgte die Bestimmung der effektiven Organanreicherung (C_{eff}). Hierzu wurde folgende Formel angewandt:

$$C_{eff} = C_{or} - (F * OG * C_b / 100)$$

C_{or} = Zählrate des Organs
 F = Mittelwert der organspezifischen Blutmenge (ul/g)
 OG = Organgewicht (g)
 C_b = Zählrate in 100 ul Blut

Die Formel fand in allen Versuchen Anwendung, in denen ^{125}I -PVP Lösung intravenös appliziert wurde. Handelte es sich um Berechnungen aus Versuchreihen mit Trägererythrozyten, in denen die Radioaktivitäten im Blut erst nach Zentrifugation und Fraktionierung in Plasma und Erythrozyten bestimmt wurden, mußte mit folgender empirischer Korrekturformel gearbeitet werden:.

$$C_{eff} = C_{or} - (C_{px} + C_{ex}) * OG * K$$

C_{px} = Zählrate in 100 ul Plasma zum Zeitpunkt Tx
 C_{ex} = Zählrate in 100 ul Erythrozyten zum Zeitpunkt Tx
 OG = Organgewicht (g)
 K = Organspezifische Konstante (1/g)
(gültig innerhalb einer Versuchsreihe)

b) Umrechnung in Prozent der applizierten Dosis:

Nach Berechnung der im jeweiligen Organ effektiv angereicherten Menge einer Testsubstanz, wurde diese als Prozentsatz der

in der entsprechenden Leermenge enthaltenen Radioaktivität berechnet.

$$x(\%) = \frac{C_{eff}}{C_1} * \frac{D_1}{D_0} * 100$$

2.6.4 Berechnung der prozentualen Abnahme einer Testsubstanz im Blut bzw. in den Erythrozyten.

Die zu den jeweiligen Zeitpunkten in 100 ul Blut, bzw. Erythrozyten gemessenen Radioaktivitäten einer Testsubstanz innerhalb einer Versuchsreihe wurden mit der maximalen Radioaktivität der entsprechenden Nullwerte in Relation gesetzt, wobei letztere als 100 Prozent bezeichnet wurde.

$$x(\%) = \frac{C_x}{C_0} * \frac{D_0}{D_x} * 100$$

Cx = Zählrate zum Zeitpunkt Tx
Co = Zählrate des "Nullwertes"
Dx = Injektionsmenge Tx
Do = Injektionsmenge To

2.7 Splenektomie

Die Exstirpation der Milz wurde in Barbituratnarkose durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren etwa 20 Minuten vor Beginn des Eingriffes intramuskulär die Dosis von 0.2-0.3 ml Pento-barbital-Na (60 mg/ml) injiziert (NEMBUTAL, Abbot Chemicals). Hierdurch kam es nach etwa 10 Minuten zu einer guten Narkose der Tiere. Allerdings zeigten einzelne Versuchstiere noch Schmerzreaktionen im Verlaufe des Eingriffes, sodaß die Barbituratnarkose mit einer initialen, kurzen Ätherinhalationsnarkose kombiniert wurde. Hierbei wurde ein kleines

Glasgefäß, das mit Äther getränkte Watte enthielt, über den Kopf des Versuchstieres gestülpt, bis sich ein Abflachen der Atemtiefe erkennen ließ. Das Glasgefäß wurde dann sofort entfernt. Diese Kombinationsnarkose ergab eine wesentlich tiefere, und für die gesamte Operationsdauer ausreichende Betäubung. Im ersten Operationsschritt wurde die äußere Haut entlang des linken Rippenbogens auf etwa 1,5 cm Länge eingeschnitten und von den Schnittträgern aus stumpf abpräpariert, bis das Operationsfeld ausreichend überschaubar war. Zumeist ließ sich bereits zu diesem Zeitpunkt die dorsolateral des Magens gelegene Milz durch die dünnen Bauchdecken hindurch erkennen. Anschließend wurden die übrigen Bauchdecken im Bereich der Milzloge mit einer Pinzette gefaßt und das Abdomen mittels eines etwa 0,5 cm langen Schnittes eröffnet (Abb.1). Durch Spreizen der Bauchmuskulatur war das gesamte Operationsfeld einzusehen und die genaue Lage der Milz auffindig zu machen. In der eröffneten Bauchhöhle wurde die Milz dargestellt und vorsichtig mit einer Pinzette gefaßt. Unter leichtem Zug konnte das Organ ohne Schwierigkeiten oder der Gefahr einer Gewebstraumatisierung einschließlich eines Teiles des Gefäßstieles nach extraperitoneal verlagert werden. Der jetzt gut sichtbare, extraperitoneal gelegene distale Abschnitt des Milzstieles wurde als Ganzes mit einer Klemme gefaßt (Abb.2). Hierbei war darauf zu achten, daß ein in zahlreichen Fällen vorhandenes Gefäß am hinteren oberen Milzpol miterfaßt und ebenfalls abgeklemmt wurde. Anschließend konnte der Milzstiel unterhalb der Klemme mittels zweier Schleifenligaturen unterbunden und die Milz distal der Ligaturen abgetrennt werden. Beide Schritte sind in den Abbildun-

gen 3 und 4 dargestellt. Abbildung 3 zeigt den ersten Schritt der Unterbindung des Milzstieles bei noch liegender Klemme. In Abbildung 4 ist die vom Gefäßstiel abgetrennte Milz dargestellt. Der Milzstiel ist auf dieser Abbildung noch nicht in das Abdomen zurückverlagert. Nachdem größere Blutungen aus dem unterbundenen Gefäßstiel ausgeschlossen werden konnten, erfolgte seine Rückverlagerung in das Abdomen. Anschließend wurden Bauchmuskulatur und äußere Haut getrennt vernäht (Abb.5 und 6). Als letztes wurden nach Beendigung der Bauchhautnaht ein kleiner Pflasterverband und ein größerer Schutzverband angelegt, einerseits um ein Sauberhalten der Wunde zu gewährleisten, andererseits um das Annagen der Wundnähte zu vermeiden. Der Schutzverband wurde 2 Tage nach der Operation entfernt.

ABBILDUNGEN ZUR SPLENEKTOMIE



Abbildung 1 : Eröffnung der Bauchhöhle

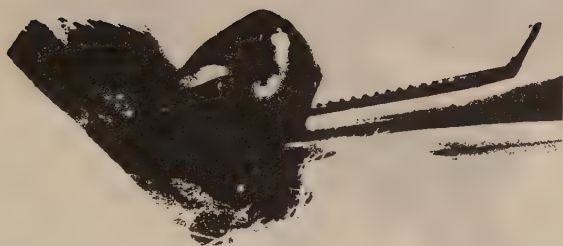


Abbildung 2 : Darstellung der Milz und Verlagerung nach extraperitoneal



Abbildung 3 : Unterbindung des Milzstieles



Abbildung 4 : Zustand nach Abtrennung der Milz



Abbildung 5 : Naht der Bauchmuskulatur



Abbildung 6 : Bauchhautnaht



Abbildung 7 : Operationsmaterial

2.8 Versuchsbeschreibungen

Versuch I

Intravenöse Injektion von ^{125}I PVP Lösung. Untersucht wurden 8 männliche NMRI-Mäuse, deren Körpergewicht zwischen 33,0 und 37,8 g schwankte. Die Messung der Radioaktivitäten in Blut, Leber, Milz, Niere und Herz erfolgte zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 15, 30, 60, 120, 180$ Minuten, sowie 24 und 48 Stunden.

Versuch II

Intravenöse Injektion von ^{125}I PVP Lösung bei 10 männlichen NMRI-Mäusen der Gewichtsklassen 25,5 bis 30,8 Gramm. Die Radioaktivitäten in Blut, Leber, Milz, Niere und Herz wurde zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 30, 60, 120, 180$ Minuten, 24 und 48 Stunden, sowie 4, 7 und 10 Tage gemessen.

Versuch III

Intravenöse Injektion von ^{125}I PVP Lösung. Die Versuchsreihe wurde mit 8 weiblichen BALB/c-Mäusen durchgeführt. Das Körpergewicht der 3-4 Wochen alten Tiere variierte zwischen 15,5 und 18,8 Gramm. Die Messung der Radioaktivitäten wurde in üblicher Weise zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 30, 60, 120$ Minuten, sowie 1, 3, 6 und 9 Tage vorgenommen.

Versuch IV

Intravenöse Injektion ^{125}I PVP beladener menschlicher Trägererythrozyten. Die Versuchsreihe wurde mit männlichen NMRI-Mäusen durchgeführt. In einem Vorversuch wurde zur Testung der Verträglichkeit artfremder menschlicher Erythrozyten bzw. Trägererythrozyten bei 3 Tieren die intravenöse Injektion gewaschener menschlicher Erythrozyten oder Trägererythrozyten

vorgenommen. Die Injektion wurde nach 3 und nach 18 Tagen wiederholt. Zur Durchführung der eigentlichen Versuchsreihe wurden menschliche Trägererythrozyten nach der unter 2.3 beschriebenen Methode hergestellt und 7 NMRI-Mäusen injiziert. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 24,4 und 28,7 g. Die Messung der Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Milz, Niere und Herz erfolgte zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 15, 30, 60, 120, 180$ Minuten und 4 Tage.

Versuch V

Intravenöse Injektion ^{125}I PVP beladener Trägererythrozyten bei 7 männlichen NMRI-Mäusen der Gewichtsklasse 26,6 bis 29,3 Gramm. Die Messung der Radioaktivitäten in üblicher Weise wurde zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 15, 30, 60, 120, 180$ Minuten und 4 Tage vorgenommen.

Versuch VI

Intravenöse Injektion ^{125}I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A bei 4 Grad Celsius. Die 7 untersuchten NMRI-Mäuse wogen zwischen 26,4 und 28,7 g. Nach $T_x = 0, 15, 30, 60, 120, 180$ Minuten und 4 Tage wurden die Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Milz, Niere und Herz bestimmt.

Versuch VII

Intravenöse Injektion ^{125}I PVP beladener Trägererythrozyten. Untersucht wurden 3 bis 4 Wochen alte männliche BALB/c-Mäuse, deren Körpergewicht zwischen 16,3 und 22,0 Gramm schwankte. Abweichend von der unter 2.3. beschriebenen Methode wurden hier bei der Herstellung der Trägererythrozyten alle Wasch-

gänge bei 20 Grad Celsius und 670 x g ausgeführt. Die Messung der Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Milz, Niere und Herz erfolgte zu den Zeitpunkten Tx = 0, 30, 60, 120 Minuten, sowie 1, 2, 4, 6 und 9 Tage.

Versuch VIII

Intravenöse Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten. Die Versuchsreihe wurde mit ca. 4 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen durchgeführt, wobei das Körpergewicht der 10 untersuchten Tiere zwischen 16,0 und 20,2 g schwankte. Die Messung der Radioaktivitäten erfolgte in üblicher Weise und erstreckte sich auf einen Zeitraum von insgesamt 18 Tagen.

Versuch IX

Intravenöse Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten bei 8 männlichen BALB/c-Mäusen der Gewichtsklasse 21,4 bis 27,9 Gramm. Die Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Milz, Niere und Herz wurden zu den Zeitpunkten Tx = 0, 30, und 180 Minuten, sowie 1, 3, 8, 13 und 15 Tage gemessen.

Versuch X

Präparation und Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach vorausgegangener 16-stündiger Lagerung der gewaschenen Erythrozyten. Die Lagerung erfolgte bei 4 Grad Celsius in Puffer A. 9 weibliche BALB/c-Mäuse der Gewichtsklasse 16,6 bis 18,4 wurden verwandt. Die Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Milz, Niere und Herz wurden zu den Zeitpunkten Tx = 0, 30, 60, 180 Minuten, 1, 2, 3, 6 und 10 Tage bestimmt wurden.

Versuch XI

Intravenöse Injektion $^{125}\text{-I}$ PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung. Nach Beendigung des vorletzten Waschganges wurde das gewonnene Zellmaterial unter Zugabe von Puffer A bei 4 Grad Celsius gelagert und nach 16 Stunden dem letzten Waschgang unterzogen. Nach Erwärmung auf 37 Grad Celsius erfolgte die Injektion bei 9 weiblichen BALB/c-Mäusen, deren Körpergewicht zwischen 14,9 und 18,8 Gramm betrug. Die Messung der Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Milz, Niere und Herz erstreckte sich über einen Zeitraum von insgesamt 9 Tagen.

Versuch XII

Intravenöse Injektion $^{125}\text{-I}$ PVP beladener Trägererythrozyten nach 4-tägiger Lagerung in Puffer A bei 4 Grad Celsius. Untersucht wurden 8 weibliche BALB/c-Mäuse. Das Körpergewicht der ca. 4 Wochen alten Tiere variierte zwischen 16,7 und 19,9 Gramm. Zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 30, 60, 180$ Minuten, 1, 2, 6 und 10 Tage wurden die Radioaktivitäten in üblicher Weise gemessen.

Versuch XIII

Intravenöse Injektion $^{125}\text{-I}$ PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie. Zur Herstellung der Trägererythrozyten wurde Blut von männlichen BALB/c-Mäusen verwandt, das unter gleichen Bedingungen 3 männlichen NMRI- und 6 männlichen BALB/c-Mäusen am 3. Tag nach Entfernung der Milz injiziert wurde. Die Versuchsreihe erstreckte sich über insgesamt 14 Tage.

Versuch XIV

Intravenöse Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie. An 9 männlichen BALB/c-Mäusen der Gewichtsklasse 21,8 bis 27,5 erfolgte am dritten Tag nach Milzexstirpation die Injektion. Die Messung der Radioaktivitäten in Plasma, Erythrozyten, Leber, Niere und Herz wurde zu den Zeitpunkten $T_x = 0, 30, 120$ Minuten, 24 Stunden sowie 3, 8, 14 und 24 Tage vorgenommen.

Versuch XV diente der Ermittlung des Gesamtblutvolumens und der Organblutvolumina mittels der direkten 125-I PVP Verdünnungsmethode. Hierzu wurden 3 männliche BALB/c-Mäuse und eine NMRI-Maus verwandt. Unmittelbar nach Injektion einer definierten Menge 125-I PVP Lösung erfolgte das Ausbluten der Mäuse und anschließend die Präparation von Leber, Milz, Niere und Herz zur Messung der jeweiligen Radioaktivitäten.

2.9 Osmotische Resistenz

Die Ermittlung der osmotischen Resistenz über die Hämoglobinfreisetzung erfolgte durch Inkubation von Zellen, d.h. sowohl von normalen Mäuseerythrozyten als auch von Erythrozytenschatten in Lösungen mit stufenweise absteigender Osmolarität. Ausgehend von einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 g% NaCl) wurde zu jeder Bestimmungsserie eine NaCl Verdünnungsreihe (0,9, 0,85, 0,8, usw. bis 0,1 g% NaCl) angesetzt. Jeweils 100 μ l des zu untersuchenden Zellmaterials wurden für 10 Minuten unter ständiger Rotation bei Raumtemperatur in 0,4 ml einer Verdünnungsstufe inkubiert und anschließend mittels einer Eppendorf-Zentrifuge 20 Sekunden zentrifugiert. Die

Bestimmung der freigesetzten Hämoglobinmenge im Überstand wurde mit der Test - Combination "Hämoglobin" der Firma BÖHRINGER MANNHEIM nach der Hämoglobincyanid Methode durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf der Umwandlung von Hämoglobin zu Hämiglobincyanid unter Zugabe von Cyanid und Ferricyanid.

Hämoglobin + Cyanid + Ferricyanid $\rightarrow$ Hämiglobincyanid.

Die Messung erfolgte im Spektralphotometer bei 546 nm (PERKIN-ELMER 550 S). Die maximale Hämoglobinkonzentration wurde als 100 prozentige Hämolyse bezeichnet und Werte geringerer Hämoglobinkonzentration als Prozentsatz dieses Wertes angegeben.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Gesamtblutvolumen und Organblutvolumina

Die errechneten Gesamtblutvolumina und deren Umrechnung in μl Blut pro Gramm Körpergewicht sind in Tabelle 19 wiedergegeben. Wie zu ersehen ist, besteht eine enge Korrelation zwischen Blutvolumen und Körpergewicht eines jeweiligen Versuchstieres. Die Einzelergebnisse schwanken zwischen 105,1 und 137,5 $\mu\text{l/g}$, wobei der höchste Wert bei einem jungen Tier mit niedrigem Körpergewicht bestimmt wurde. Der angegebene Mittelwert von 114,08 μl Blut pro Gramm Körpergewicht mit einer Standardabweichung (s) von 13,4 wurde allen weiteren Berechnungen zugrunde gelegt.

In der Leber fand sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den nach der 125-I PVP-Verdünnungsmethode und den nach der analogen Methode mit Trägererythrozyten bestimmten Blutmengen (Tab. 20). Wesentliche Anreicherungen zum Zeitpunkt Null lassen sich bei der Methode mit Trägererythrozyten nicht feststellen. Die Streubreite der Einzelwerte liegt zwischen 101,5 und 191,0 μl Blut pro Gramm Organgewicht, der Mittelwert bei 143,2 $\mu\text{l/g}$ (s = 37,8)

Die Bestimmung der Milzblutmenge erfolgte ausschließlich mittels der 125-I PVP Verdünnungsmethode. Die Einzelergebnisse schwanken zwischen 79,5 und 212,0 μl Blut pro Gramm Organgewicht, der Mittelwert aus 8 Bestimmungen liegt bei 123,5 $\mu\text{l/g}$ (s = 52,0).

Bei der Bestimmung der Nierenblutmenge kam ausschließlich die Methode mit Trägererythrozyten zur Anwendung, die 125-I PVP Verdünnungsmethode erwies sich hier aufgrund einer initialen Anreicherung als ungeeignet. Der Mittelwert der Nierenblutmenge aus 7 Bestimmungen beträgt 197,7 μ l Blut pro Gramm Organgewicht (Standardabweichung = 27,9), wobei die Einzelwerte zwischen 146,9 und maximal 235,5 μ l/g schwanken (Tab. 20). Somit erwies sich die Niere als das blutreichste der hier untersuchten Organe.

Die im Herzmuskelparenchym vorhandene Blutmenge liegt im Mittel bei 123,6 μ l/g, die Standardabweichung beträgt 24,5. Der Vergleich von 5 nach der 125-I PVP Verdünnungsmethode mit 7 nach der analogen Methode mit Trägererythrozyten bestimmten Werten zeigt, daß erstere durchschnittlich etwas höher liegen, größenordnungsmäßig jedoch einander entsprechen. Die Einzelwerte schwanken zwischen 74,9 und 167,7 μ l/g.

3.2 Einschluß von radioaktiv markiertem PVP in Trägererythrozyten

Mittels des Verfahrens der reversiblen hypoosmotischen Hämolyse ließen sich bei Zugabe von 125-I Polyvinylpyrrolidon (125-I PVP) zum extrazellulären Puffer innerhalb des Dialysesäckchens bis zu 31 Prozent der zugefügten Aktivität in die Trägererythrozyten einschließen. Nach der Dialyse gegen hypoosmotischen Puffer und anschließender Dialyse gegen isosmotischen Puffer fand sich in allen Fällen Hämoglobin in der extrazellulären Flüssigkeit, welche durch Zentrifugation von den Erythrozyten abgetrennt wurde. In Kontrollexperimenten, in denen die Mäuseerythrozyten nicht gegen hypoosmoti-

schen sondern gegen isoosmotischen Puffer dialysiert wurden, konnte nach zweimaligem Waschen der Zellen keine Radioaktivität gemessen werden. Hieraus ergibt sich, daß bei isoosmotischer Dialyse sowohl kein Einschluß in die Erythrozyten, als auch keine Absorption von ^{125}I PVP an die Erythrozytenmembran stattfindet.

3.3 Splenektomie

Die hier angewandte Methode der Splenektomie, einschließlich des Narkoseverfahrens ließ sich einfach und frei von Komplikationen durchführen. Keines der Tiere verstarb während der Operation oder in der postoperativen Phase. Die Aufwachzeit lag in der Regel 20 - 60 Minuten nach Beendigung des Eingriffes, gefolgt von einer raschen Erholungsphase der Tiere. In den meisten Fällen kam es nach ca. 2 Stunden zu einer spontanen Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme der Mäuse. Im Verhalten der Tiere ließen sich keine merklichen Unterschiede zu dem nichtoperierter Tiere erkennen. Wiederholte Gewichtskontrollen in der postoperativen Phase ergaben nur unwesentliche Schwankungen, ein wesentlicher Gewichtsverlust im Vergleich zum ursprünglichen Körpergewicht war nicht zu verzeichnen. Der makroskopische Befund an Abdominalorganen und Peritonäum derjenigen Tiere, die im Rahmen der Versuchsanordnung ad exitum kamen, erlaubte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Rückschlüsse auf peritonitische Reaktionen oder sonstige auffällige pathologische Veränderungen, obwohl zur Durchführung des Eingriffes keine aseptischen Maßnahmen ergriffen wurden.

3.4 I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung

Bei direkter intravenöser Injektion von 125-I PVP Lösung fand sich eine rasche Clearance der Testsubstanz. Die Halbwertszeit lag bei etwa 30 Minuten (Tab. 1-3, 15). Die zeitliche Verlaufskurve des Mittelwertes der Blutkonzentration aus 3 Versuchsreihen (Abb. 1) zeigt einen steilen exponentiellen Abfall, nach 4 Tagen ist die Blutkonzentration auf unter 1 Prozent des Ausgangswertes abgesunken. Die entsprechende zeitliche Verlaufskurve der 125-I PVP Anreicherung im Lebergewebe ist gekennzeichnet durch einen langsamen Anstieg bis zum 4. Tag nach Injektion. Der Mittelwert liegt bei 8 Prozent der Gesamtdosis. Nach 6-10 Tagen finden sich konstante Werte der in der Leber gemessenen 125-I PVP Konzentration bei etwa 7-8 Prozent. Die Betrachtung der einzelnen Versuchsreihen zeigt sowohl für die ersten 3 Stunden, als auch für die längeren Verlaufsbeobachtungen, daß die Einzelwerte der Leberanreicherung innerhalb einer jeweiligen Reihe von gleicher Größenordnung sind. Hinsichtlich der Verwendung unterschiedlicher Zuchtstämme, ergibt der Vergleich zwischen NMRI-Mäusen (Versuche I und II) und BALB/c-Mäusen (Versuch III), keinen eindeutigen Unterschied. Die 125-I PVP Anreicherung im Milzgewebe läßt zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Werte über 1,0 Prozent der Gesamtdosis erkennen, der höchste gemessene Wert liegt bei 0,8 Prozent nach drei Tagen in Versuch III. In der Niere betragen die unmittelbar nach Injektion bestimmten Werte bis maximal 9,5 Prozent der Gesamtdosis. Nach 30 Minuten läßt sich ein Abfall der gemessenen Radioaktivität auf durchschnittlich 0,8 Prozent feststellen, nach

3 Stunden und auch im weiteren zeitlichen Verlauf finden sich Werte unter 0,5 Prozent. In gleicher Weise ergibt die Untersuchung der 125-I PVP Anreicherung im Herzmuskelgewebe, daß sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine nennenswerte Konzentration messen läßt. Die Zählraten im Herzmuskelgewebe liegen im Vergleich zur Leber nach 1 und mehr Tagen zahlenmäßig um 2 Zehnerpotenzen niedriger (Tab 36-38).

3.5 I.v.-Injektion 125-I PVP beladener menschlicher Trägererythrozyten in Mäuse.

In den Tabellen 4, 24 und 39 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit intravenöser Injektion menschlicher Trägererythrozyten wiedergegeben. Die in einem Vorversuch getestete Verträglichkeit artfremder Erythrozyten bzw. Trägererythrozyten ließ auch bei Wiederholung der Injektion sowohl nach 3 als auch nach 18 Tagen in keinem der Fälle (n = 3) besondere Begleiterscheinungen oder Veränderungen erkennen. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, findet ein sehr rascher Abbau der injizierten Trägererythrozyten statt. Nach 4 Tagen lassen sich keine Trägererythrozyten mehr im zirkulierenden Blut nachweisen. Die Aufnahme im Lebergewebe ist gekennzeichnet durch einen raschen Anstieg bereits unmittelbar nach Injektion. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Anreicherung von mehr als 20 Prozent der applizierten Dosis. Im Milzparenchym hingegen ist die Anreicherung mit durchschnittlich ca. 2 Prozent gering. Nieren- und Herzmuskelgewebe zeigen keine nennenswerten Anreicherungen.

3.6 I.v.-Injektion von ^{125}I PVP beladenen Mäusererythrozyten in Mäuse.

Der Verlauf nach intravenöser Injektion von ^{125}I PVP beladenen Trägererythrozyten bei NMRI-Mäusen ist in den Abbildungen 2-3, sowie in den Tabellen 5, 25 und 40 wiedergegeben. Hinsichtlich der Überlebenszeit der Trägererythrozyten ergab sich ein rascher Abfall mit einer Halbwertszeit von ca. 3 Stunden. Nach 4 Tagen fanden sich noch etwa 30 Prozent des Ausgangswertes im zirkulierenden Blut. Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist verlaufen die ^{125}I PVP Anreicherungen in Leber und Milz annähernd parallel. In beiden Organen werden rasch initiale Maximalwerte erreicht, anschließend folgt ein geringer linearer Anstieg bis zum 4-Tageswert. Die maximalen Anreicherungen mit 11,1 Prozent in der Leber, bzw. 13,6 Prozent in der Milz liegen im Vergleich zu den weiter unten beschriebenen Versuchsreihen relativ niedrig.

In einer entsprechenden Versuchsanordnung, ebenfalls mit männlichen NMRI-Mäusen (Versuch VI), bei der jedoch die Trägererythrozyten vor Injektion 16 Stunden gelagert wurden, ergibt sich ein ähnlich steiler Anstieg der ^{125}I PVP Anreicherung in Leber und Milz (Abb. 5, Tab. 6, 26, 41). In beiden Organen werden jedoch sowohl im Verlauf der ersten 3 Stunden, als auch nach 24 Stunden deutlich höhere Werte erreicht, wobei die in der Milz gemessene Anreicherung annähernd das Zweifache der Leberwerte beträgt. Die Überlebenszeit der injizierten Trägererythrozyten ist dementsprechend wesentlich niedriger als in Versuch V. Bereits der nach 15 Minuten bestimmte Wert von 27 Prozent liegt unterhalb des

vergleichbaren Wertes aus Versuch V. Im weiteren Verlauf ergibt sich ein linearer Abfall der Überlebenskurve bis hin zu einem 24 Stundenwert von 18 Prozent.

Bei der vom üblichen Herstellungsverfahren der Trägererythrozyten (siehe 2.3) abweichenden Durchführung der einzelnen Waschgänge bei 20 Grad Celsius und 670 x g (Versuch VII), kam es zu einer geringeren Überlebensrate der Trägererythrozyten (Tab. 7, 27, 42). 24 Stunden nach Injektion fanden sich noch 27 Prozent des Ausgangswertes im zirkulierenden Blut, im weiteren Verlauf ergab sich, wie in Abb. 6 dargestellt, eine lineare Abnahme bis auf etwa 9 Prozent des Ausgangswertes am 9.Tag. In Leber und Milz kam es nach einem mäßig raschen Anstieg auf jeweils ca. 10 Prozent der Gesamtdosis innerhalb der ersten 24 Stunden zu einer zunehmenden Anreicherung bis zum 6. Tag, wobei mit 16 Prozent in der Leber und 25 Prozent in der Milz Maximalwerte erreicht wurden (Abb. 7).

Die Versuche VIII und IX, die unter identischen Bedingungen mit weiblichen und männlichen BALB/c-Mäusen durchgeführt wurden, zeigen die besten Überlebenszeiten der Trägererythrozyten. In beiden Untersuchungsreihen war sowohl die initiale Phase der raschen Elimination weniger deutlich ausgeprägt, als auch eine längere Überlebenszeit der zirkulierenden Trägererythrozyten zu verzeichnen. Die Halbwertszeit der Trägererythrozyten liegt in Versuch VIII mit weiblichen BALB/c-Mäusen bei ca. 48 Stunden (Tab.8, Abb.8), in Versuch IX finden sich nach 24 Stunden noch ca. 37 Prozent des Ausgangswertes (Tab.9, Abb.10). Im weiteren Verlauf zeigt sich

in beiden Versuchsreihen eine annähernd gleichgerichtete lineare Abnahme, wobei die Unterschiede im Fehlerbereich der Methode liegen. Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen ergeben sich jedoch hinsichtlich der 125-I PVP Anreicherung in Leber und Milz. Versuch VIII mit weiblichen BALB/c-Mäusen (Abb. 9) zeigt in der Leber eine rasche initiale Sättigung auf 12,5 Prozent der Gesamtdosis nach 24 Stunden, danach ergibt findet sich ein langsamer linearer Anstieg bis annähernd 17 Prozent. In der Milz ist nach 48 Stunden mit 30 Prozent der Gesamtdosis ein Maximum erreicht, anschließend kommt es zu einem mäßigen Abfall der Anreicherungs-werte. Die entsprechende Versuchsreihe mit männlichen BALB/c-Mäusen dagegen zeigt sowohl für die Leber als auch für die Milz deutlich geringere Anreicherungen, wobei vergleichbare Maximalwerte mehr als 30 Prozent niedriger liegen.

Abbildung 12 zeigt die vergleichende Darstellung der Trägererythrozytenelimination der Versuchsreihen X, XI und XII, in denen die Lagerfähigkeit von Erythrozyten und Trägererythrozyten im Hinblick auf die hier angewandten Versuchsmethoden untersucht wurde (Tab. 10-12, 30-32, 45-47). Dabei erwies sich das Verfahren der 16-stündigen Lagerung der gewaschenen Erythrozyten mit anschließender Präparation von Trägererythrozyten als das relativ günstigste hinsichtlich der in vivo Überlebensfähigkeit. Bei 16-stündiger Lagerung von Trägererythrozyten kam es zu einem sehr raschen initialen Abfall auf nahezu 10 Prozent des Ausgangswertes, eine weitere Abnahme ließ sich bis zum 10. Tag nach Injektion nicht mehr nachweisen. Die 4-tägige Lagerung von Trägererythrozyten führte zu einer vergleichsweise besseren in vivo Überlebensfähigkeit

des injizierten Zellmaterials während der ersten 48 Stunden, nach 6 bzw. 10 Tagen fanden sich dagegen jeweils Werte unter 5 Prozent und somit weniger als in allen übrigen vergleichbaren Versuchsreihen. In allen 3 Versuchsreihen, in denen unterschiedliche Methoden der Lagerung von Erythrozyten und Trägererythrozyten angewandt wurden, lassen sich relativ hohe 125-I PVP Meßwerte sowohl im Leber- als auch im Milzgewebe nachweisen (Abb. 13-15). Nach einer unterschiedlich stark ausgeprägten Initialphase der Anreicherung bis zu einer annähernden Sättigung nach 48 Stunden, ist der Verlauf der Leberanreicherungskurven mehr oder weniger linear. Mit über 19 Prozent der Gesamtdosis finden sich die höchsten Anreicherungen bei 16-stündiger Lagerung der Trägererythrozyten (Versuch XI). Im Milzparenchym lassen sich in allen Versuchsreihen Maximalwerte von über 30 Prozent der Gesamtdosis nachweisen, wobei hier nach 16-stündiger Lagerung von Erythrozyten (Versuch X) die vergleichsweise höchsten Werte erreicht werden.

Durch das Verfahren der Splenektomie konnte bei ansonsten unter gleichen Voraussetzungen durchgeführten Versuchsreihen eine deutlich höhere in vivo Überlebenszeit von Trägererythrozyten erzielt werden (Tab. 13, 14, 33, 34, 48, 49). Gleichzeitig ließ sich darstellen, daß bei der hier gewählten Versuchsanordnung unter Verwendung von gepooltem Blut mehrerer Tiere immunologische Reaktionen von untergeordneter Bedeutung waren, da sich auch bei Verwendung unterschiedlicher Zuchtstämme zur Injektion von Trägererythrozyten (Versuch XIII) wesentlich höhere Überlebenszeiten fanden. Der in Ab-

bildung 16 dargestellte zeitliche Verlauf der prozentualen Abnahme zirkulierender Trägererythrozyten zeigt eine vergleichbar langsame exponentielle Abnahme mit Erreichen der Halbwertszeit nach ca. 8 Tagen. Der anschließende Kurvenverlauf ist linear, wobei sich noch nach 24 Tagen mehr als ein Drittel des Ausgangswertes im zirkulierenden Blut nachweisen läßt. Die unterschiedliche Überlebenszeit von Trägererythrozyten ohne und nach Splenektomie ist besonders anschaulich in der semilogarithmischen Darstellung auf Abbildung 18 zu erkennen. Als Weiteres konnte durch die Exstirpation der Milz eine höhere $^{125}\text{-I}$ PVP Anreicherung in der Leber erzielt werden. Während in allen übrigen Versuchsanordnungen - abgesehen von der Verwendung artfremder menschlicher Trägererythrozyten - die Anreicherungswerte deutlich unter 20 Prozent der applizierten Gesamtdosis lagen, fanden sich nach Splenektomie Werte bis maximal 26,5 Prozent. Die in Abbildung 17 aufgezeigte Anreicherung unterscheidet sich von der Mehrzahl der übrigen Versuche durch einen weniger stark ausgeprägten initialen Anstieg und auch durch die mehr exponentielle als lineare Kurvenform im weiteren zeitlichen Verlauf (Abb. 17). Eine vergleichende Darstellung der $^{125}\text{-I}$ PVP Anreicherung in Leber und Milz ohne Splenektomie bzw. in der Leber nach Splenektomie ist sowohl für die Initialphase (Abb. 19), als auch für den Langzeitverlauf (Abb. 20) zusammenfassend wiedergegeben. Hierbei wurden für die Anreicherungen in Leber und Milz die Mittelwerte aller Versuchsreihen ohne Splenektomie als Bezugspunkte gewählt (Tab. 16).

In allen Versuchsreihen mit $^{125}\text{-I}$ PVP beladenen Mäuseträgererythrozyten ließen sich weder im Nieren-, noch im Herzmuskelgewebe Radioaktivitäten bestimmen, die Rückschlüsse auf eine Anreicherung erlaubten, die gemessenen Zählraten waren in allen Fällen auf die im Organblut vorhandene Radioaktivität zurückzuführen. Initial erhöhte $^{125}\text{-I}$ PVP Plasmaspiegel zeigten eine rasche, der direkten intravenösen $^{125}\text{-I}$ PVP Injektion entsprechende Clearance.

3.7 Osmotische Resistenz

Normale Mäuseerythrozyten und Erythrozyten, die 24 Stunden bei 4 Grad Celsius in einer 10 mM Glucoselösung inkubiert waren, zeigen ein einheitliches Verhalten der osmotischen Resistenz, wobei die Zellen bei gleicher Osmolarität hämolysiert werden. Erythrozyten, die 24 Stunden bei 4 Grad Celsius in Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer (Puffer A) inkubiert waren, lassen eine geringere Tendenz zur Hämolysen bei vergleichbaren Osmolaritäten erkennen. Zu einem Zeitpunkt, da in den vorgenannten Fällen bereits zwischen 40 und 50 Prozent der Zellen hämolysiert sind, findet sich hier eine Hämolysen von 25 Prozent (Tab. 17). Die Kurve der osmotischen Resistenz beschreibt jeweils einen steilen Anstieg (Abb. 21). Trägererythrozyten von Mäuseerythrozyten weisen in allen Fällen eine veränderte osmotische Resistenz auf. Aufgrund des Einsetzens der Hämolysen bei unterschiedlichen Osmolaritäten zeigt sich eine deutliche Abflachung des Kurvenverlaufes (Tab. 18, Abb. 22). Auffällig war, daß ein Teil der Trägererythrozyten mehr als normale Erythrozyten bereits bei Osmo-

laritäten gering unter der Blutosmolarität hämolysierten. In sämtlichen Fällen kam es zu einer stufenweise zunehmenden Hämolysen mit weniger steil ausgeprägtem Kurvenverlauf als bei normalen Erythrozyten. Ein Teil der Trägererythrozyten erwies sich zum Zeitpunkt der vollständigen Hämolysen normaler Erythrozyten als resistent, d.h. es kam zu einer Verzögerung der kompletten Hämolysen. Hinsichtlich des Vergleiches der Präparationsmethoden von Trägererythrozyten zeigte sich, daß bei 4 Grad Celsius und 500 x g gewaschene Zellen eine höhere osmotische Resistenz aufweisen als Zellen, die bei 20 Grad Celsius und 670 x g gewaschen wurden. Trägererythrozyten, die bei 500 x g und 4 Grad Celsius hergestellt und anschließend bei der gleichen Temperatur 24 Stunden in Puffer A gelagert wurden, erwiesen sich bei niedrigen Osmolaritäten geringfügig resistenter als vergleichbare Zellen ohne Lagerung.

4. DISKUSSION

Für die Untersuchungen wurden als Laboratoriumstiere Mäuse ausgewählt, da frühere vergleichende in vitro Untersuchungen ergaben, daß von allen kleinen Laboratoriumstieren nur von der Maus Erythrozytenschatten mit befriedigendem Ergebnis präpariert werden können (Sprandel et al. 1981 b). Es kamen Mäuse unterschiedlichen Lebensalters zur Verwendung, um altersspezifische Einflüsse auf den Versuchsablauf möglichst zu vermeiden. Um geschlechtsspezifische Unterschiede auszuschließen bzw. herauszustellen, wurden männliche und weibliche Mäuse untersucht. Für beide Gesichtspunkte ergaben sich jedoch im Verlauf dieser Studie keine eindeutigen Anhaltspunkte, wobei sicherlich zu berücksichtigen ist, daß größere Einzelabweichungen auf individuelle Unterschiede zurückzuführen sind. NMRI-Mäuse wurden ausgewählt, da dieser Zuchtstamm relativ hohe Körpergewichte aufweist, was sowohl mit einem größeren Gesamtblutvolumen als auch mit einer einfacheren Handhabung der Tiere hinsichtlich der Versuchsanordnung verbunden ist. Da es sich bei NMRI-Mäusen jedoch um keinen reinen Inzuchtstamm handelt, und das Blut mehrerer Mäuse zur Präparation von Erythrozytenschatten bzw. Trägererythrozyten gepoolt wird, war die Verwendung dieses Zuchtstammes aufgrund eventueller Inkompatibilitäten limitiert. Diesem Aspekt Rechnung tragend, wurden daher vorwiegend BALB/c-Mäuse für die Versuche herangezogen, wobei es sich hier um einen reinen Inzuchtstamm handelt. BALB/c-Mäuse weisen keine Blutgruppenantigene auf (Mitteilungsblatt des Zentralinstitutes für Versuchstiere, Hannover 1981). Nach-

teilig erwies sich bei Verwendung von BALB/c-Mäusen deren geringeres Körpergewicht und das damit verbundene geringere Gesamtblutvolumen, nicht zuletzt aber auch der im Vergleich zu NMRI-Mäusen erheblich höhere Preis.

Mit der Methode der hypoosmotischen Dialyse konnten in Mäuse-erythrozyten Makromoleküle wie 125-Iod markiertes Albumin oder 125-Iod markiertes Polyvinylpyrrolidon eingeschlossen werden. Der Prozentsatz des Einschlusses der zugefügten Makromoleküle war niedriger als bei Erythrozyten von Menschen oder von Hunden und gleichzeitig mit einem erhöhten Verlust an Zellen verbunden, bewegte sich aber trotzdem in einem Umfang, der es erlaubt, Erythrozytenschatten von Mäusen für experimentelle in vivo Versuche zu verwenden. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, Erythrozytenschatten aus Erythrozyten von Ratten zu gewinnen, da es bei allen untersuchten Methoden zur Ausbildung von Hämoglobinkristallen kommt, wie rasterelektronenmikroskopisch belegt werden konnte (Sprandel et al. 1981 b). In Erythrozyten von Ratten konnten daher auch keine radioaktiv markierten Makromoleküle eingeschlossen werden. Erythrozytenschatten von Meerschweinchen erwiesen sich bereits in vitro als so instabil, daß es nach jedem Waschgang in der Zentrifuge zu erneutem Zellverlust und Hämoglobinaustritt kam, und somit nur 3 Prozent der zugefügten Makromoleküle eingeschlossen werden konnten (Sprandel et al. 1981 b). In den vorliegenden Versuchen mit Mäusen wurden bis zu 31 Prozent des zugefügten 125-Iod Polyvinylpyrrolidons in die Erythrozyten eingeschlossen. Diese Zahlen berücksichtigen die Zellverluste während der Präparationsmethode. Im Ver-

gleich zu menschlichen Erythrozyten lag der prozentuale Einschluß dagegen in allen Versuchen niedriger (Sprandel et al. 1979 a, Stark 1981). Die Tatsache, daß bei Versuchen, in denen die Erythrozyten nicht gegen hypoosmotischen, sondern gegen isoosmotischen Puffer dialysiert wurden, nach 3 Waschgängen keine Radioaktivität in der Zellfraktion nachzuweisen war, beweist, daß es sich tatsächlich um Einschluß und nicht um Absorption der Makromoleküle handelt. Daraus ist ebenfalls zu folgern, daß sich die Zellen während der hypoosmotischen Dialyse öffnen und dabei die Makromoleküle einschließen. Gleichzeitig gelangt während dieses Vorganges Hämoglobin in die extrazelluläre Flüssigkeit. Die Dialyse gegen isoosmotischen Puffer führt dann wieder zum Verschuß der Zellen. 125-Iod Polyvinylpyrrolidon wurde als Makromolekül gewählt, da es biologisch inert ist, nicht abgebaut wird sowie im Blut und in allen Organen aufgrund der radioaktiven Markierung leicht meßbar ist. Darüberhinaus steht es als Diagnostikum zu vergleichsweise niedrigen Kosten kommerziell zu Verfügung.

Die exakte Beurteilung der Aufnahme der radioaktiv markierten Substanz bzw. der beladenen Trägererythrozyten erfordert die Erfassung der Organdurchblutung, da die gemessene Gesamtradioaktivität um den Anteil der Radioaktivität im Blut eines jeweiligen Organes gemindert werden muß. Angaben über die Durchblutungsgrößen von Organen bei Mäusen werden nur von wenigen Autoren in der Literatur gegeben (FRIEDMAN 1955, FRIEDMAN 1959, KALISS and PRESSMAN 1950, WHISH et al. 1950, in: ALTMAN and DITTMER 1971). Beim Vergleich der einzelnen

Werte fallen insbesondere die zum Teil großen Unterschiede je nach Untersucher auf. Diese Schwankungen dürften einerseits auf methodische Unterschiede zur Erfassung der Durchblutungs-
werte zurückzuführen sein, zum anderen ist sicherlich auch eine Abhängigkeit von biologischen Faktoren wie Zuchtstamm, Alter, Geschlecht, Zuchtmethoden etc. gegeben. Zirkadianer Rhythmus, Fütterung und Flüssigkeitszufuhr stellen bekannte Einflüsse auf Gesamtblutvolumen und Organdurchblutung dar (LÖRCHER 1981). Die in dieser Arbeit ermittelten Werte lagen durchschnittlich niedriger als die der meisten anderen Autoren, wobei die Schwankungen jedoch in einem vertretbaren Rahmen liegen. Beispielsweise fanden sich für die Niere in den Literaturangaben Unterschiede zwischen 340 $\mu\text{l/g}$ (KALISS and PRESSMANN 1950) und 117 $\mu\text{l/g}$ (WISH et al. 1950), der hier bestimmte Mittelwert lag bei 191 μl Blut pro Gramm Nierengewebe. Über die Durchblutung des Herzens fand sich keine Literaturangabe. Die auch in den eigenen Ergebnissen gefundenen Schwankungen dürften im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß die Tiere durch die Methode der Blutabnahme am Entblutungsschock ad exitum kamen, wobei das Schockgeschehen hier sicherlich großen individuellen Schwankungen unterlag.

Zwei Methoden der Substanzverdünnung fanden zur Erfassung des Organblutgehaltes Anwendung, zum einen die direkte intravenöse Injektion 125-Iod markierten Polyvinylpyrrolidons (125-I PVP), zum anderen die intravenöse Injektion von 125-I PVP beladenen Trägererythrozyten. In Erythrozyten eingeschlossenes 125-I PVP wurde nicht zur Bestimmung der Organ-

durchblutung der Milz herangezogen, da es hier zu einer raschen initialen Anreicherung der wahrscheinlich durch die Präparationsmethode alterierten Erythrozyten kam. Frei verabreichtes $^{125}\text{-I}$ PVP zeigte in ähnlicher Weise eine initiale Anreicherung im Nierenparenchym, was auf eine passagere glomeruläre oder tubuläre Anreicherung des Makromoleküls Polyvinylpyrrolidon ($\text{MG} = 30\text{-}40\ 000$) zurückgeführt wurde. Hier erwies sich die Verwendung von $^{125}\text{-I}$ PVP beladenen Trägererythrozyten als die Methode der Wahl. Im Falle der Niere und des Herzens ließen sich die ermittelten Durchblutungsgrößen in den weiteren Versuchen auch empirisch bestätigen, da durch Einsetzen des betreffenden Wertes die gesamte Organradioaktivität auf die des Organblutes zurückgeführt werden konnte. Generell zeigten jüngere Versuchstiere größere relative Gesamtblutmengen und auch größere relative Organblutvolumina als ältere Tiere.

Die praktische Anwendung eines zellulären Trägersystems, in diesem Falle Erythrozyten, erfordert unter anderem eine möglichst hohe in vivo Überlebensrate der mit der therapeutischen Substanz beladenen Zellen. Voraussetzung hierzu ist die Herstellung von Erythrozytenschatten bzw. Trägererythrozyten, welche im wesentlichen normalen Erythrozyten entsprechen, sei es in Zellinhalt und Zellstoffwechsel, Membrantransporteigenschaften, Morphologie oder biophysikalischen Verhalten. Dementsprechend ist bei der Wahl der Präparationstechnik darauf zu achten, daß Hämoglobin und andere intraerythrozytäre Substanzen wie Enzyme und energiereiche Substrate weitestgehend in der Zelle belassen werden. In zahl-

reichen in vitro und in vivo Untersuchungen konnte dargestellt werden, daß durch die hier angewandte hypoosmotische Dialysemethode Erythrozytenschatten hergestellt werden können, bei denen die in der Zelle verbleibenden Hämoglobinemengen und die übrigen intrazellulären Bestandteile annähernd im Bereich der physiologischen Norm liegen (SPRANDEL et al 1979 b). Die Aufrechterhaltung eines normalen Energiestoffwechsels geht mit einer vermehrten Resistenz der Erythrozytenschatten einher (STARK 1981).

Ein weiterer wesentlicher Parameter der in vitro und in vivo Überlebensfähigkeit von Erythrozytenschatten ist die Aufrechterhaltung einer normalen Zellmorphologie. Diese basiert in erster Linie auf der Integrität des physiologischen Zellstoffwechsels, andererseits hängt sie wesentlich von einem möglichst schonenden Herstellungsverfahren ab (GRIMES 1980). Es konnte gezeigt werden, daß unter optimalen Bedingungen präparierte Erythrozytenschatten von Menschen und Hunden auch im elektronenmikroskopischen Bild normalen Erythrozyten entsprechen. Erythrozytenschatten von Mäusen wiesen jedoch ein von normalen Mäuseerythrozyten abweichendes Bild auf (SPRANDEL et al. 1980 a). In dieser Arbeit wurde am Tiermodell belegt, daß sich bei der Anwendung unterschiedlicher Präparationsmethoden eine direkte Beziehung zur in vivo Überlebensfähigkeit der Erythrozytenschatten herstellen läßt. So ergab sich unter Anwendung der hier durchgeführten Präparationsmethode eine Halbwertszeit von bis zu 2 Tagen für zirkulierende Trägererythrozyten, und auch nach 10 Tagen überlebten noch 25 Prozent der injizierten Zellen. Durch Modifikation

der Präparationstechnik, wobei alle Waschgänge bei 20 Grad Celsius und 670 x g ausgeführt wurden, kam es zu einer deutlichen Verkürzung der Überlebensfähigkeit. Hier fanden sich schon nach 24 Stunden nur noch 27 Prozent der injizierten Trägererythrozyten im zirkulierenden Blut. Bei entsprechenden Untersuchungen an Hunden wurden in vivo Überlebenszeiten der Trägererythrozyten gefunden, die annähernd denen normaler Erythrozyten entsprachen (SPRANDEL et al. 1980 c).

Andere Präparationsmethoden von Erythrozytenschatten, wie das Verfahren der direkten Dilution oder das dielektrische Durchbruchverfahren, gehen mit einem erheblichen Verlust an Hämoglobin und der für die Glycolyse erforderlichen Enzyme einher. Solche Zellen haben sich bereits in vitro als wenig stabil erwiesen (SPRANDEL et al. 1979 a). Auch die in vivo Überlebensfähigkeit dieser Zellen ist im Gegensatz zu der in diesen Experimenten angewandten Präparationsmethode wesentlich verkürzt (THORPE et al. 1975, ZIMMERMANN et al. 1978, SPRANDEL et al. 1981 a).

Das in vitro Verhalten gelagerter Erythrozytenschatten wurde eingehend untersucht (STARK 1981). Der Aspekt der Lagerungsfähigkeit ist insofern relevant, als eine direkte Verarbeitung des Blutes bzw. der Erythrozyten in der klinischen Praxis allein schon aus technischen Gründen nicht generell möglich sein dürfte. In vitro Untersuchungen zeigten, daß bei menschlichen Erythrozytenschatten die Lagerung in Glucose - Adenosinphosphat - MgCl₂ Puffer zu einer Verbesserung der osmotischen Resistenz eines Teiles der Zellen führt (SPRANDEL et al. 1981 e). Dieses Ergebnis konnte bei Verwendung von

Mäusen nicht in dieser eindeutigen Form bestätigt werden. Ein geringerer Anteil von Erythrozytenschatten erwies sich jedoch auch bei Trägererythrozyten von Mäusen resistenter als normale Erythrozyten. Dies gilt gleichwohl für gelagerte Zellen und nicht gelagerte Zellen. Die Untersuchungen ergaben, daß alle angewandten Formen der Lagerung von Erythrozytenschatten mit einer Verringerung der Überlebenszeit in vivo einhergehen. Hier muß angenommen werden, daß bei Reinjektion Zellpopulationen stark unterschiedlicher Resistenz vorlagen, - dies gilt sowohl für Versuchsreihen mit als auch ohne Lagerung - sodaß insbesondere der weniger resistente Anteil sehr rasch aus der Zirkulation eliminiert wurde. Ein Trennungsvorgang dieser Zellpopulationen mittels Inkubation in Medien erniedrigter Osmolarität (200 mmosmol/l) wurde nicht durchgeführt, da aufgrund der geringen Blutmengen bei Mäusen Trägererythrozyten nur in begrenztem Umfang zu Verfügung standen. Da es sich bei allen Versuchsreihen um initial identisches Zellmaterial handelte, und da auch die gleichen Präparationsmethoden zur Herstellung von Trägererythrozyten angewandt wurden, ist die Verminderung der Überlebensfähigkeit bei Lagerung als Folge einer zusätzlichen Schädigung der Zellen anzusehen. Die vergleichende Betrachtung der einzelnen Lagerungsverfahren zeigt, daß die besten Resultate bei 16-stündiger Lagerung der unbehandelten Erythrozyten und erst anschließender Herstellung von Trägererythrozyten erzielt wurden. Nach Injektion von Trägererythrozyten, die 16 Stunden gelagert wurden, ergab sich ein äußerst rascher Abfall der Trägererythrozyten im zirkulierenden Blut, wobei bereits nach

2 Stunden annähernd 90 Prozent des injizierten Zellmaterials nicht mehr nachzuweisen war. Allerdings kam es im weiteren zeitlichen Verlauf bis zum zehnten Tag zu keinem zusätzlichen Zellverlust. Dieser Verlauf ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß während der vorausgegangenen Lagerung der größte Teil der Trägererythrozyten soweit geschädigt wurde, daß diese Zellen in vivo sehr rasch abgebaut werden. Bei den überlebenden Zellen dürfte es sich dementsprechend um die bereits oben erwähnte resistente Zellpopulation handeln, die sich in vivo praktisch wie normale Erythrozyten verhält. Deutlich langsamer erfolgte der initiale Zellverlust bei Reinjektion 4 Tage gelagerter Trägererythrozyten. Nach 2 Tagen fanden sich hier noch 27 Prozent des Ausgangswertes im zirkulierenden Blut, allerdings war am sechsten Tag ein erheblicher Abfall auf weniger als 5 Prozent festzustellen. Hierbei dürfte davon ausgegangen werden, daß nach 4-tägiger Lagerung der Großteil der weniger resistenten Zellen bereits hämolysiert wird, und somit zur Injektion nur noch die resistentere Zellfraktion gelangt. Dies erklärt den verzögerten Abbau in vivo während der ersten 48 Stunden. Auffällig ist, daß nach 6 Tagen weniger als 5 Prozent der Zellen wiedergefunden werden, sodaß angenommen werden kann, daß die lange Lagerung mit einer spürbaren Schädigung auch der resistenten Zellpopulation einhergeht. Bei 16-stündiger Lagerung überlebt in etwa die doppelte Zellmenge im vergleichbaren Zeitraum.

Durch die Splenektomie konnte eine erhebliche Verlängerung der in vivo Überlebenszeiten von Trägererythrozyten erreicht

werden sowie auch die rasche Elimination eines Teiles dieser Zellen reduziert werden. So war beispielsweise während der ersten 24 Stunden ein vergleichsweise geringer Zellverlust von ca. 20-30 Prozent des Ausgangswertes zu verzeichnen. Der weitere Verlauf der Trägererythrozyten Überlebenskurve entsprach dem normaler Mäuseerythrozyten. Diese Tatsache und auch die Ergebnisse der übrigen Versuche sprechen dafür, daß die in vivo Überlebensfähigkeit von Trägererythrozyten im wesentlichen von der Veränderung der Zellphysiologie und der wahrscheinlich damit verbundenen morphologischen Alteration abhängig ist. Diese weitestgehend zu reduzieren wird Aufgabe weiterer differenzierter Untersuchungen zur Verbesserung der Präparationstechniken sein, da bei Anwendung am Menschen die Milzexstirpation als ultima ratio angesehen werden muß. Es kam zu keinen immunologischen Reaktionen mit Beeinträchtigung der Überlebenszeiten bei diesen Untersuchungen. Die Verwendung von Trägererythrozyten von BALB/c Mäusen, die splenektomierten NMRI Mäusen injiziert wurden, zeigte ähnlich gute Überlebenszeiten. Im Gegensatz hierzu wurden artfremde menschliche Trägererythrozyten nach Injektion in NMRI-Mäuse sehr rasch aus der Zirkulation eliminiert, jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz in der Milz angereichert. Wesentlich höhere Anreicherungen fanden sich jedoch in der Leber. In diesem Falle dürfte es zur immunologisch bedingten Phagozytose durch Makrophagen gekommen sein.

Daß durch den Einschluß einer Substanz in Erythrozyten in vivo eine Verminderung bzw., Aufhebung der substanzbedingten immunologischen Reaktionen erreicht werden kann, wurde be-

reits von anderen Untersuchern eindeutig dargestellt (THORPE et al. 1975, FIDDLER et al. 1977). Ein weiterer anzustrebender Effekt bei der therapeutischen Anwendung von Trägererythrozyten ist es, den Gesamtorganismus oder einzelne Organsysteme vor nachteiligen Nebenwirkungen der eingeschlossenen Substanz zu schützen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich in Nieren, Herz, sowie in ausgewählten Fällen auch in Lungen, Gehirn und Extremitäten keine nennenswerten Anreicherungen der in Trägererythrozyten eingeschlossenen Substanzen nachweisen ließen. Auch die mit einem initialen Zerfall eines Teiles der injizierten Zellen verbundene Freisetzung von Polyvinylpyrrolidon war im Vergleich zur direkten intravenösen Injektion von 125-I PVP Lösung sehr gering. Diese Freisetzung war im Übrigen von einer raschen Clearance begleitet. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine Verminderung der substanzspezifischen Nebenwirkungen auf diese Weise realisierbar ist.

Eine wesentliche Fragestellung dieser Studie war, inwiefern durch das therapeutische Prinzip der pharmakonbeladenen Trägererythrozyten eine organspezifische Anreicherung, speziell in der Leber, erreicht werden kann. Entsprechende Untersuchungen wurden bereits mit Erythrozytenschatten, die nach der Methode der direkten Dilution (THORPE et al. 1975) oder des dielektrischen Durchbruches (ZIMMERMANN et al. 1977) hergestellt wurden durchgeführt. DELOACH et al. (1977) untersuchten die Leberanreicherung von Erythrozytenschatten, die mit 0,125 prozentiger Glutaraldehydlösung vorbehandelt worden waren. Bei der hier angewandten Präparationsmethode von Träger-

erythrozyten mittels reversibler hypoosmolarer Hämolyse sollte auf zusätzliche chemische oder sonstige Manipulationen verzichtet werden, um mit möglichst normalen Zellen arbeiten zu können.

Die Halbwertszeit von frei injiziertem 125-I Polyvinylpyrrolidon (PVP), die unter 30 Minuten lag, konnte in allen Versuchen, in denen 125-I PVP in Erythrozyten eingeschlossen und in eine Schwanzvene reinjiziert wurde, erheblich verlängert werden. Die kurzfristige initiale Anreicherung von 125-I PVP im Nierengewebe nach direkter intravenöser Injektion wurde in Versuchen mit Injektion von 125-I PVP beladenen Trägererythrozyten nicht beobachtet. Die rasche Clearance nach freier 125-I PVP Injektion dürfte auch für die Tatsache verantwortlich sein, daß nur maximal 8 Prozent der applizierten Dosis zur Leber gelangen und sich dort anreichern. Nach Einschluß von 125-I PVP in Erythrozyten und deren Reinjektion fand sich in diesem Organ eine annähernd doppelt so hohe Anreicherung.

Aus der Modifikation des Präparationsverfahrens von Trägererythrozyten (Zentrifugation bei 670 x g und 20 Grad Celsius) resultierte eine Verminderung der Überlebenszeiten zirkulierender Zellen, eine veränderte Anreicherung in der Leber oder in der Milz war jedoch nicht zu erreichen. Mittels der verschiedenen Lagerungsmethoden ließ sich nur im Falle des 16-stündigen Lagerns der Trägererythrozyten eine vermehrte 125-I PVP Aktivität in der Leber messen. Auffällig waren in allen Versuchsreihen mit Lagerung von Trägererythrozyten bzw. von Erythrozyten die deutlich erhöhten Anreicherungswerte in der

Milz, was auf die in diesen Versuchen vorliegenden instabilen Zellformen zurückzuführen ist.

Durch das Verfahren der Splenektomie mit anschließender Injektion von Trägererythrozyten kam es zu wesentlich erhöhten $^{125}\text{-I}$ PVP Anreicherungswerten in der Leber. Im Vergleich zu den entsprechenden Versuchsreihen ohne Splenektomie ließen sich bis zu 50 Prozent höhere Werte erzielen, was einer zusätzlichen Anreicherung von annähernd 10 Prozent der insgesamt injizierten Dosis entspricht. Bezogen auf Untersuchungen mit frei injizierter $^{125}\text{-I}$ PVP Lösung, konnte die Aufnahme in die Leber um etwa das Dreifache gesteigert werden. Auffällig war, daß nach Splenektomie die Kurve der $^{125}\text{-I}$ PVP Anreicherung in der Leber einen langsameren Anstieg zeigte. In den Versuchen ohne Splenektomie kam es in der Regel bereits innerhalb der ersten Stunden zu einer annähernden Sättigung sowohl in der Leber als auch in der Milz, wogegen sich nach Splenektomie eine kontinuierliche Zunahme der $^{125}\text{-I}$ PVP Anreicherung über mehrere Tage darstellte. Somit ließ sich durch die operative Ausschaltung der Milzfunktion eine vermehrte Aufnahme von Trägererythrozyten durch die Leber nachweisen, wobei dieser Effekt gleichzeitig mit einer veränderten Anreicherungskinetik einherging, die auf den deutlich verzögerten Abbau der beladenen Trägererythrozyten quantitativ zurückzuführen ist. Es sollte gezeigt werden, daß sich durch Reduzierung oder Ausschaltung der Milzfunktion eine kompensatorische Aktivierung der Leber erreichen läßt. Hieraus wäre möglicherweise zu folgern, daß der gleiche Effekt durch weniger geschädigte Zellen erreicht werden

könnte, was wiederum ein weitere Verbesserung des Herstellungsverfahrens von Trägererythrozyten erfordert.

Im Gegensatz zur freien ^{125}I PVP Injektion, bei der es zu keiner effektiven Anreicherung in der Milz kam, führte der Einschluß von ^{125}I PVP in Erythrozyten und deren intravenöse Injektion zu hohen Anreicherungswerten. Dies ist auf einen vermehrten Abbau der durch das Präparationsverfahren alterierten Zellen in der Milz zurückzuführen, der, wie die Ergebnisse zeigen gegenüber normalen Erythrozyten wesentlich erhöht ist. In anderen Studien konnte gezeigt werden, daß Erythrozytenschatten von Mäusen im rasterelektronenmikroskopischen Bild ein von normalen Mäuseerythrozyten abweichendes morphologisches Bild aufweisen (SPRANDEL et al. 1980 a). Diese vermehrte Anreicherung in der Milz ist fraglos ein unerwünschter Effekt, wenn eine therapeutisch wirksame Substanz zur Leber befördert werden soll. Die Untersuchungen mit Mäusen nach Milzexstirpation zeigten deutlich, daß es zu wesentlich höheren Anreicherungen von Trägererthrozyten im Leberparenchym kommt. Der Effekt der vermehrten Milzanreicherung könnte jedoch auch vorteilhaft genutzt werden, wenn Chemotherapeutika oder andere Substanzen hochdosiert zur Milz dirigiert werden sollten.

Offen bleibt, aufgrund welcher detaillierter Mechanismen die Anreicherung von Trägererythrozyten in der Leber abläuft, ebenso die Frage nach dem eigentlichen Grund der kompensatorisch erhöhten Anreicherungen in diesem Organ nach Splenektomie. Für die Anreicherung von Trägererythrozyten in der

Milz ist sicherlich deren morphologische Alteration von vorrangiger Bedeutung, wogegen für die Leber andere und zusätzliche Mechanismen zu diskutieren sind. Dies ist alleine schon daraus ersichtlich, daß nach Splenektomie keine vollständige Übernahme der Milzfunktion durch die Leber erfolgt, sondern eine zusätzliche Verlängerung der Überlebenszeiten zirkulierender Trägererythrozyten und auch eine Veränderung der Verlaufskurve der Leberanreicherung im Sinne eines langsameren und kontinuierlichen Anstieges resultiert. Dieser Verlauf wird immer dann einen erwünschten Effekt darstellen, wenn eine therapeutisch wirksame Substanz in konstanten Mengen über einen längeren Zeitraum appliziert werden soll. Andere Organsysteme zeigten auch nach Splenektomie keine vermehrten Anreicherungswerte.

Ein weiterer offener Aspekt, der eingehender Untersuchungen bedarf, ist die Frage nach der eigentlichen Lokalisierung der Trägererythrozyten und der eingeschlossenen Substanz im subzellulären Bereich der Leber. Diese Frage ist insofern von klinischer Relevanz, als daß es sich bei der Applikation einer in Trägererythrozyten eingeschlossenen therapeutischen Substanz primär um eine "unspezifische" Interaktion zwischen Organ und Trägerzelle handelt. Erst im zweiten Schritt nach Freisetzung der Substanz kommen deren spezifische Eigenschaften zum Tragen. So muß beispielsweise für ein über das Trägersystem verabreichtes Enzym in der Enzymsubstitutionstherapie eine andere Pharmakokinetik angenommen werden, als für ein appliziertes Chemotherapeutikum.

THORPE et al. fanden bei Mäusen mit angeborenem β -Glucuronidase Mangel, denen mit β -Glucuronidase von Rindern beladene Erythrozytenschatten injiziert wurden, daß sich innerhalb weniger Stunden über 70 Prozent der eingeschlossenen Substanz in der Leber nachweisen ließen (THORPE et al. 1975). Erstaunlicherweise fanden sich in dieser Studie in der Milz nur sehr geringe Enzymaktivitäten. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellt sich die Frage, ob nicht dieser hohe Wert auf die Freisetzung des Enzymes durch raschen Zerfall der mittels direkter Dilution präparierten Trägerzellen zurückzuführen ist, bzw. ob nicht das freigesetzte artfremde Enzym vielmehr infolge einer spezifischen Affinität zur Leber gelangt als durch Vermittlung des zellulären Trägersystems. Bemerkenswerterweise liegt die angegebene in vivo Halbwertszeit der Erythrozytenschatten mit 20 Minuten weitaus niedriger als die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte. Dies erklärt auch, daß bei THORPE et al. die in der Leber gemessene Enzymaktivität bereits nach 14 Stunden wieder abnimmt, da eine kontinuierliche Inkorporation zirkulierender Trägerzellen über einen längeren Zeitraum nicht ermöglicht wird. ZIMMERMANN et al. fanden für Erythrozytenschatten, die nach der Methode des dielektrischen Durchbruchs präpariert wurden, vergleichbar niedrige in vivo Überlebenszeiten. Die Halbwertszeit wird mit ca. 30 Minuten angegeben (ZIMMERMANN et al. 1978). Die in dieser Arbeit bei Mäusen berichtete Leberanreicherung von eingeschlossenem Methotrexat liegt mit 75-100 Prozent der Gesamtdosis extrem hoch. Hierbei handelte es sich jedoch um Werte, die 10 Minuten nach Injektion ermittelt wurden, anschließend läßt sich eine der direkten Metho-

trexatinjektion annähernd entsprechende, rasche Clearance feststellen. Dieser Verlauf legt ebenfalls die Vermutung nahe, daß zwar eine initial hohe Anreicherung von Erythrozytenschatten in der Mikrozirkulation der Leber erreicht wird, nach deren raschem Zerfall aber die Freisetzung von Methotrexat der direkten intravenösen Injektion entspricht. Somit dürfte die injizierte therapeutische Substanz auch nicht in vermehrtem Maße ihren eigentlichen Bestimmungsort, die Leberzelle erreichen. Der Vergleich dieser Arbeiten mit den hier vorliegenden Ergebnissen zeigt, daß mittels der Methode der reversiblen hypoosmotischen Hämolyse Trägererythrozyten hergestellt werden können, die die effektive Anreicherung eines Makromoleküles in der Leber ermöglichen. Dieser Schluß erscheint umsomehr berechtigt, da mit Polyvinylpyrrolidon ein biologisch inertes Makromolekül eingesetzt wurde, was die Fehlerquelle einer substanzspezifischen Leberaffinität weitgehend reduzierte. Das von DELOACH et al. beschriebene Verfahren, Trägererythrozyten nach Glutaraldehydinkubation vermehrt zur Leber zu dirigieren, sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden (DELOACH et al. 1977). Allerdings ließen sich bei der angegebenen Glutaraldehydkonzentration von 0,125 Prozent keine verwertbaren Zellen herstellen, sodaß ausführlichere in vivo Untersuchungen dieses Verfahrens nicht unternommen wurden. Dennoch bietet dieses Konzept der gezielten Vorbehandlung von Trägererythrozyten einen interessanten Aspekt für weitere eingehendere Untersuchungen über die Organselektivität des erythrozytären Trägersystems.

Die Anwendung des osmotischen Resistenztestes als Parameter der Beurteilung von Erythrozyten und Erythrozytenschatten von Mäusen, stellt eine einfache und sinnvolle Methode der in vitro Kontrolle unterschiedlicher Präparations- und Lagerungsmethoden dieser Zellen dar. Es kann davon ausgegangen werden, daß Erythrozyten von Mäusen im wesentlichen die gleichen physiologischen Eigenschaften wie menschliche Erythrozyten besitzen. Normale menschliche Erythrozyten weisen einen steilen Abfall der osmotischen Resistenz auf, wobei es in der Regel zur vollständigen Hämolyse in Lösungen entsprechend einer Osmolarität von 0,4 g% kommt. Die Studie von HAM und CASTLE (1940) ergab, daß bereits in höherosmolaren Lösungen eine Hämolyse dann auftritt, wenn normale Erythrozyten 24 Stunden ohne irgendwelche Zusätze bei 37 Grad Celsius gelagert werden. Eine ausführliche Beschreibung des Hämolysevorganges findet sich bei PONDER (1948). Infolge der Lagerung von Erythrozyten kommt es zum Verbrauch Glucose, zu einem Abfall von ATP und letztendlich zu einer Störung des Elektrolythaushaltes mit Anstieg der intrazellulären Kationenkonzentration. Die weitere Folge ist ein Wassereinstrom in die Zelle mit resultierender Vergrößerung des Zellvolumens und erhöhter Hämolysebereitschaft. Zusätzlich kommt dem Verlust an membrangebundenem Cholesterin, welcher eine Verminderung der Membranoberfläche nach sich zieht, eine nicht unerhebliche Bedeutung bei der Veränderung der osmotischen Resistenz länger gelagerter Erythrozyten zu (MURPHY 1967). Unter den Bedingungen standardisierter Testverfahren der osmotischen Resistenz, bei denen die osmotische Belastung des Erythrozy-

ten abrupt erfolgt, kommt es aufgrund der Elektrolytverschiebungen zur Hämolyse. Dabei verhalten sich diese Zellen wie Osmometer, d.h. ihre normale bikonkave Form verändert sich in hypoosmotischen Lösungen bis das größtmögliche Volumen bei kleinstmöglicher Oberfläche erreicht ist. Weiterer Volumenanstieg bei Zunahme der osmotischen Belastung führt zur Hämolyse. Infolge struktureller Veränderungen der Zellmembran kommt es zu einem Austritt von Hämoglobin und anderen Zellbestandteilen in das extrazelluläre Milieu (PONDER 1948). Innerhalb bestimmter Grenzen ist die Erythrozytenmembran jedoch elastisch, insbesondere dann, wenn die osmotische Belastung allmählich und verzögert erfolgt (DANON et al. 1954, KATSCHALSKY et al. 1960). Diese Eigenschaft wird bei der Präparation von Erythrozytenschatten mittels reversibler hypoosmotischer Hämolyse ausgenutzt. STARK konnte zeigen, daß menschliche Erythrozytenschatten im Hinblick auf die osmotische Resistenz keine einheitliche Zellpopulation darstellen, sondern daß der Abfall der osmotischen Resistenz in stufenweiser Form erfolgt. Hierbei fand sich für einen Teil der Zellen eine Hämolyse bereits bei Osmolaritäten, die gering unter den isoosmotischen Werten lagen (STARK 1981).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß normale Mäuseerythrozyten menschlichen Erythrozyten entsprechende Eigenschaften hinsichtlich der osmotischen Resistenz aufweisen. Durch 24-stündige Inkubation in Glucose - Adenosin - $MgCl_2$ Puffer konnte eine leichte Verringerung der Tendenz zur Hämolyse bei vergleichbaren Osmolaritäten erreicht werden. Dies veranschaulicht den positiven Effekt eines substratreichen

Inkubationsmediums auf die Widerstandsfähigkeit der Erythrozyten. Dieser positive Effekt war bei 24-stündiger Lagerung von Erythrozytenschatten im gleichen Inkubationsmedium nicht eindeutig nachzuweisen. Ebenso zeigt der Vergleich mit einer entsprechenden Studie, durchgeführt mit menschlichen Erythrozytenschatten (STARK 1981), daß eine Verbesserung der osmotischen Resistenz nur für ein weitaus kleinere Zellpopulation erreicht werden konnte. Es ließ sich jedoch belegen, daß Erythrozytenschatten von Mäusen, wie auch die entsprechenden menschlichen Zellen, sich aus unterschiedlich resistenten Zellpopulationen zusammensetzen, was durch den stufenförmigen Verlauf der Kurve der osmotischen Resistenz dokumentiert wird. Eine eindeutige Korrelation besteht zwischen dem in vivo gefundenen Ergebnis der Trägererythrozyten - Überlebenszeiten bei unterschiedlichen Präparationsmethoden und dem Verlauf der bei entsprechenden Zellen untersuchten osmotischen Resistenz. Insofern kann der Test der osmotischen Resistenz als wertvoller Parameter der Beurteilung einzelner Herstellungsmethoden und -modifikationen von Erythrozytenschatten angesehen werden.

Es war somit möglich, über das erythrozytäre Trägersystem eine Substanz vermehrt in der Mäuseleber anzureichern beziehungsweise sie partiell dorthin zu dirigieren. Inwieweit dieses bei anderen Spezies, insbesondere beim Menschen möglich sein wird, und ob dieses Verfahren für mehrere oder alle Substanzen Gültigkeit besitzt, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Dieser Effekt könnte vorteilhaft bei all jenen Krankheitsbildern ausgenutzt werden, bei denen eine

therapeutisch wirksame Substanz überwiegend oder ausschließlich in der Leber zur Geltung kommen soll. Hierbei sei insbesondere an solche Substanzen gedacht, die in üblicher, freier Form verabreicht mit lokalen oder systemischen toxischen oder allergischen Reaktionen verbunden sind. Als Beispiel seien hochgereinigte, unter großem Aufwand hergestellte Enzyme genannt, deren potentielles Anwendungsgebiet in der Enzym-substitutionstherapie angeborener Stoffwechselleiden liegt. Hier wiederum vorwiegend bei solchen Krankheitsbildern, in denen der primäre Defekt in der Leber zu suchen ist. Ein repräsentatives Beispiel für die sinnvolle Verwendung einer Reihe anderer Substanzen sei hier nur das Chemotherapeutikum Daunamycin erwähnt, dessen Cardiotoxizität bereits bei therapeutisch wirksamen Dosen durch Einschluß in Trägererythrozyten umgangen werden könnte.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Erythrozytenschatten können als biologisch abbaubare Trägersysteme für exogene Enzyme oder Chemotherapeutika verwandt werden. Dabei ist eine optimal lange Überlebenszeit anzustreben, wenn die therapeutisch wirksame Substanz innerhalb der Erythrozyten wirken oder mit deren Zerstörung freigesetzt werden soll. Der Einschluß in die Erythrozyten erlaubt es, das Pharmakon geschützt zu bestimmten Organen zu transportieren. Voraussetzung der Enzymsubstitutionstherapie ist es, das fehlende Enzym zum Zielorgan, meist der Leber, zu dirigieren. Unter Verwendung von Mäusen wurde daher das Schicksal eingeschlossener Makromoleküle in vivo verfolgt und ihre Aufnahme in die verschiedenen Organe erfaßt. Mittels der Methode der reversiblen hypoosmotischen Dialyse wurden Zellen präpariert, die in vielerlei Hinsicht normalen Mäuseerythrozyten entsprachen und daher als Trägererythrozyten bezeichnet wurden. Unterschiede betrafen die osmotische Resistenz, wobei Erythrozytenschatten sich als minder resistent erwiesen. In die Trägererythrozyten wurde 125-Jod markiertes Polyvinylpyrrolidon (125-I PVP) eingeschlossen und nach Reinjektion über die Radioaktivität deren in vivo Überlebensfähigkeit und die Aufnahme in die verschiedenen Organe untersucht. Bei Anwendung optimaler Präparationsmethoden lag die Halbwertszeit der Trägererythrozyten im Blut bei 2 Tagen. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, daß es nur in der Leber und in noch höherem Maße in der Milz zur Anreicherung des eingeschlossenen Makromoleküls kam. Die Anreicherungswerte in der Leber lagen etwa um das Zweifache höher als nach freier Injektion von 125-I Polvinylpyrrolidon. Unter Anwendung unterschiedlicher Lagerungsmethoden kam es zu einer Minderung der in vivo Über-

lebenszeiten und zu vermehrter Anreicherung in der Milz. Nach Splenektomie ergab sich eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit um 50 Prozent der reinjizierten Trägererythrozyten und auch zu einer vermehrten, jedoch verzögerten Aufnahme in die Leber. Es konnte durch in vivo Untersuchungen an der Maus gezeigt werden, daß Makromoleküle, die in Erythrozyten eingeschlossen wurden, wesentlich länger im Plasma nachweisbar sind und zu höheren Konzentrationen in der Leber führen, als dies im Vergleich zu frei injizierten Makromolekülen der Fall ist.

TABELLEN

TEIL I

125-I PVP Anreicherungen in Leber und Milz

125-I PVP Abnahme in Blut und Erythrozyten

Alle Angaben in %

Leber und Milz: Prozent der Gesamtdosis

Blut und Erythrozyten: Prozent des Ausgangswertes (Nullwert)

TAB. 1 : VERSUCH I, i.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Blut
0 min	1.1	-	100
15	0.3	-	60.0
30	0.8	-	47.9
60	0.4	-	43.3
120	0.4	-	37.4
180	0.2	-	25.0
24 h	2.9	0.3	20.1
48	4.2	0.5	9.6

TAB. 2 : VERSUCH II, i.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Blut
0 min	2.2	0.2	100
30	1.1	0.1	62.0
60	2.1	0.2	42.1
120	0.8	0.1	35.7
180	1.6	0.2	29.5
24 h	6.6	0.5	12.8
48	8.0	0.7	1.8
4 T	8.1	0.7	1.0
7	7.3	0.7	0.3
10	7.5	0.6	0.3

TAB. 3 : VERSUCH III, i.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Blut
0 min	1.4		100
60	1.7		33.2
120	3.3	0.1	30.3
24 h	8.1	0.6	8.8
3 T	8.0	0.8	0.7
6	7.7	0.6	0.1
9	7.1	0.6	0.1

TAB. 4: VERSUCH IV, Injektion 125-I PVP beladener menschlicher Trägererythrozyten, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min	15.3	0.6	100
15	17.9	2.4	100
30	30.9	5.1	100
60	19.4	2.7	17.6
120	15.9	0.8	16.8
180	23.1	1.1	20.5
4 T	21.7	1.7	0

TAB. 5 : VERSUCH V, Injektion 125-I PVP beladener Erythrozytenschatten, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min		1.2	100
15	3.2	6.5	100
30	7.8	8.8	70.6
60	9.2	7.0	58.0
120	13.5	9.6	63.0
180	8.9	10.3	48.1
4 T	11.1	13.6	29.0

TAB. 6 : VERSUCH VI, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min	2.3	1.0	100
15	4.0	12.4	27.2
30	9.2	20.1	11.7
60	10.2	22.0	27.3
120	12.6	27.8	9.6
180	16.4	23.4	12.4
24 h	15.7	27.1	18.2

TAB. 7 : VERSUCH VII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten (Alle Waschgänge bei 20 Grad Celsius und 670 x g), BALB/c männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min	1.4	1.5	100
30	12.5	9.5	32.2
60	11.1	6.4	35.3
24 h	9.9	10.4	27.4
48	12.7	17.7	21.7
4 T	15.5	17.0	26.7
6	16.1	25.7	16.6
9	8.8	9.9	8.6

TAB. 8 : VERSUCH VIII, Injektion 125-I PVP beladener Träger-erythrozyten, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min		0.2	100
30	8.8	15.2	65.0
24 h	12.5	27.8	49.4
48	12.1	30.5	51.6
4 T	15.0	28.3	40.9
7	12.2	21.8	33.4
10	16.8	26.1	25.2
18	15.2	20.7	11.8

TAB. 9 : VERSUCH IX, Injektion 125-I PVP beladener Träger-erythrozyten, BALB/c männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min		1.4	100
30	8.1	18.3	53.1
24 h	9.4	20.4	36.8
3 T	9.0	17.4	32.7
8	9.8	20.2	28.5
13	8.7	14.8	13.7
15	10.0	15.1	18.0

TAB. 10 : VERSUCH X, Präparation und Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung der gewaschenen Erythrozyten, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min	1.1	0.5	100
30	15.3	16.5	49.8
180	14.7	21.2	54.4
24 h	14.0	35.4	45.6
48	13.6	24.5	32.0
3 T	15.3	34.7	24.7
6	11.8	46.4	20.1
10	17.5	32.1	7.7

TAB. 11 : VERSUCH XI, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min	3.2	2.4	100
30	7.2	15.3	73.6
60	14.7	23.9	16.6
120	19.7	20.6	10.4
24 h	19.0	21.3	9.7
48	16.3	26.2	6.3
3 T	19.4	31.7	11.1
5	18.1	22.5	12.7
9	15.5	22.7	11.2

TAB. 12 : VERSUCH XII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 4-tägiger Lagerung in Puffer A, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min		0.5	100
30	4.9	19.2	100
180	8.5	23.1	51.6
24 h	10.7	30.9	29.8
48	16.2	31.0	27.3
6 T	16.2	26.1	4.8
10	13.1	30.4	4.2

TAB. 13 : VERSUCH XIII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie, BALB/c männlich, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
BALB/c			
0 min	2.2	--	100
180	7.3	--	100
24 h	19.8	--	79.1
3 T	17.4	--	39.2
9	13.3	--	59.9
14	16.4	--	42.0
NMRI			
0 min	2.0	--	100
24 h	19.8	--	67.9
9 T	23.3	--	84.8

TAB. 14 : VERSUCH XIV, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie, BALB/c männlich

Zeit	Leber	Milz	Erys
0 min		--	100
0		--	100
30	4.7	--	97.4
120	6.6	--	100
24 h	12.0	--	71.3
3 T	13.6	--	71.6
8	20.4	--	46.0
14	26.5	--	40.4
24	23.8	--	34.5

TEIL II

MITTELWERTE ($\bar{x}$) und STANDARDABWEICHUNGEN (s)

TAB. 15 :
125-I PVP Lösung i.v.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche I, II, III.
A) prozentuale Anreicherung in der Leber (% der Gesamtdosis)
B) prozentuale Abnahme des Blutspiegels (% des Ausgangswertes)

Zeit	A)	$\bar{x}$	s	B)	$\bar{x}$	s
0 min		1.6	0.6		100	
15					60.0	
30		1.5	0.9		54.0	7.2
60		1.4	0.9		39.5	5.5
120		1.5	1.5		34.5	3.7
180		0.9	0.9		27.2	3.2
24 h		6.1	3.0		13.9	5.7
48		6.6	3.4		5.7	5.5
3-4		8.2	0.1		0.9	0.2
5-6		7.8	0.3		0.2	0.1
7-10		7.6	0.3		0.2	0.1

TAB. 16 :
I.v.-Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten

Prozentuale Anreicherung in Leber und Milz (% der Gesamtdosis)

Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche V-XII

Zeit	LEBER		MILZ	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0 min	2.0	0.9	1.1	0.7
15	3.6	0.6	9.5	4.2
30	9.2	3.2	15.4	4.2
60	9.7	4.2	17.0	7.3
120	10.7	5.6	17.2	9.3
180	12.1	4.0	18.5	5.8
24 h	13.0	3.5	24.8	8.2
48	14.2	2.0	26.0	5.4
3-4 T	14.2	3.6	23.8	8.8
5-6	14.9	2.6	30.2	10.9
7-9	11.4	3.4	18.7	5.9
10-13	14.0	4.0	25.9	7.8
14-18	12.6	3.7	17.9	4.0

TEIL III

OSMOTISCHE RESISTENZ

(Angaben in Prozent der maximalen Hämolyse)

TAB. 17 : Osmotische Resistenz normaler Mäuseerythrozyten

- A) unbehandelte Erythrozyten
- B) Inkubation in 10 mM Glucose 24 Stunden bei 4 Grad C
- C) Inkubation in Puffer A 24 Stunden bei 4 Grad C

g% NaCl	A	B	C
0.90	6	7	6
0.85	8	7	6
0.80	10	7	8
0.75	11	8	7
0.70	11	7	9
0.65	13	7	10
0.60	14	7	12
0.55	14	11	12
0.50	18	24	16
0.45	43	48	25
0.40	87	87	75
0.35	93	96	89
0.30	99	96	99
0.25	99	98	99
0.20	100	100	100
0.10	100	100	100

TAB. 18 : Osmotische Resistenz von Trägererythrozyten

- A) Waschgänge bei 4 Grad C, 500 x g
- B) Waschgänge bei 20 Grad C, 500 x g
- C) Inkubation in Puffer A, 24 h bei 4 Grad C

g% NaCl	A	B	C
0.90	8	14	14
0.85	8	16	14
0.80	7	16	20
0.75	9	20	23
0.70	18	33	22
0.65	22	32	23
0.60	24	34	23
0.55	27	36	26
0.50	28	52	32
0.45	42	60	33
0.40	52	73	47
0.35	79	78	69
0.30	91	94	95
0.25	96	100	98
0.20	100	100	100
0.10	100	100	100

TEIL IV

BLUTVOLUMINA

TAB. 19 :

Gesamtblutvolumen und Blutmenge pro Gramm Körpergewicht

X = Gesamtblutvolumen (ul)

x = Blutmenge pro Gramm Körpergewicht (ul/g)

Nr.	X	x
1	2353	137.5
2	4262	106.0
3	2661	105.1
4	2746	108.5
5	3026	112.8

Mittelwert: $\bar{x}$ = 114.08

Standardabweichung: s = 13.40

TAB. 20 : Blutvolumina von Leber, Milz, Niere und Herz

(Angaben in ul pro Gramm Organgewicht)

Methode	Leber	Milz	Niere	Herz
PVP	189.0	212.0		
PVP	184.3	109.6		154.8
PVP	191.0	198.0		
PVP	185.5	94.9		
PVP	107.2	83.4		133.5
PVP	105.5	118.4		126.0
PVP	105.4	79.5		119.0
PVP	114.6	92.1		167.7
bTE	182.2		235.5	120.4
bTE	128.5		146.9	74.9
bTE	125.9		216.6	127.6
bTE	126.8		204.2	136.0
bTE	189.7		194.5	96.4
bTE	111.3		203.4	107.0
bTE	101.5		182.7	119.9
$\bar{x}$	143.2	123.5	197.7	123.6
s	37.8	52.4	27.9	24.5

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

PVP = 125-I PVP Verdünnungsmethode

bTE = " Verdünnungsmethode" mit 125-I PVP beladenen Trägererythrozyten

TEIL V

Körper- und Organgewichte, Injektionsmengen

(Alle Gewichtsangaben in Gramm)

Die angegebenen Leermengen beziehen sich auf die zur Ermittlung der injizierten Gesamtaktivität einbehaltenen Kontrollproben der betreffenden Testsubstanz.

TAB. 21 : VERSUCH I, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
NMRI männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	35.03	1.633	0.083	0.244	0.133	0.110
15	35.64	1.794	0.083	0.233	0.162	0.106
30	34.70	1.785	0.097	0.252	0.127	0.095
60	34.91	1.738	0.091	0.216	0.102	0.102
120	35.61	1.885	0.088	0.270	0.150	0.101
180	37.82	1.890	0.399	0.241	0.119	0.097
24 h	33.01	1.585	0.080	0.212	0.141	0.098
48	35.60	1.872	0.195	0.290	0.141	0.113
				Leermenge		0.100

TAB. 22 : VERSUCH II, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
NMRI männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	28.71	1.458	0.074	0.245	0.133	0.089
30	26.24	1.268	0.067	0.170	0.129	0.080
60	29.66	1.7879	0.074	0.196	0.113	0.079
120	30.29	1.664	0.089	0.212	0.124	0.108
180	25.51	1.319	0.059	0.200	0.129	0.075
24 h	26.22	1.578	0.088	0.207	0.130	0.087
48	26.95	1.425	0.093	0.233	0.111	0.073
4 T	26.75	1.541	0.098	0.222	0.131	0.093
7	30.79	1.576	0.083	0.221	0.118	0.084
10	27.82	1.475	0.074	0.240	0.128	0.103
				Leermenge		0.091

TAB. 23 : VERSUCH III, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
BALB/c weiblich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	17.11	0.771	0.082	0.107	0.080	0.084
30	16.46	0.831	0.081	0.130	0.086	0.076
60	18.75	0.923	0.096	0.148	0.095	0.083
120	16.29	0.769	0.077	0.108	0.080	0.083
24 h	17.85	0.822	0.080	0.135	0.093	0.075
3 T	17.92	0.893	0.106	0.126	0.082	0.067
06	17.59	0.815	0.095	0.122	0.090	0.025
9	15.56	0.955	0.084	0.109	0.073	0.060
				Leermenge		0.101

TAB. 24 : VERSUCH IV, Injektion 125-I PVP beladener menschlicher Trägererythrozyten, NMRI männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	24.41	1.178	0.078	0.146	0.082	0.124
15	27.24	1.210	0.091	0.155	0.087	0.134
30	27.89	1.285	0.080	0.160	0.099	0.126
60	28.45	1.525	0.098	0.186	0.103	0.136
120	28.73	1.384	0.081	0.172	0.115	0.130
180	26.00	1.418	0.061	0.184	0.101	0.117
4 T	28.10	1.405	0.086	0.219	0.119	0.137
				Leermenge		0.168

TAB. 25 : VERSUCH V, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten, NMRI männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	26.59	1.322	0.080	0.161	0.100	0.113
15	27.55	1.361	0.079	0.195	0.093	0.109
30	28.97	1.443	0.088	0.245	0.114	0.095
60	29.32	1.523	0.091	0.186	0.105	0.215
120	28.79	1.603	0.112	0.224	0.115	0.102
180	28.42	1.387	0.081	0.220	0.117	0.089
4 T	28.10	1.405	0.086	0.219	0.119	0.105
				Leermenge		0.145

TAB. 26 : VERSUCH VI, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A, NMRI männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	26.42	1.269	0.086	0.189	0.068	0.115
15	27.38	1.295	0.080	0.190	0.082	0.108
30	28.71	1.310	0.089	0.194	0.081	0.108
60	28.12	1.533	0.084	0.190	0.090	0.107
120	28.23	1.704	0.086	0.197	0.084	0.115
180	26.81	1.518	0.082	0.191	0.085	0.092
24 h	28.41	1.762	0.079	0.206	0.115	0.093
				Leermenge		0.122

TAB. 27 : VERSUCH VII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten (Waschgänge bei 20 Grad C und 670 x g).

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	16.37	0.691	0.055	0.106	0.076	0.093
30	18.87	0.817	0.062	0.140	0.075	0.105
120	20.26	1.048	0.071	0.161	0.092	0.111
24 h	19.08	0.985	0.061	0.146	0.081	0.070
48	20.25	1.075	0.092	0.162	0.097	0.068
4 T	20.19	1.050	0.071	0.161	0.094	0.073
6	17.70	1.039	0.064	0.151	0.093	0.089
9	21.85	1.346	0.078	0.178	0.098	0.072
				Leermenge		0.114

TAB. 28 : VERSUCH VIII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten. BALB/c weiblich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	17.71	0.864	0.061	0.098	0.073	0.097
30	16.02	0.699	0.071	0.084	0.056	0.088
60	17.98	0.971	0.069	0.098	0.069	0.116
120	17.84	0.919	0.071	0.111	0.069	0.087
24 h	17.92	0.935	0.083	0.108	0.073	0.115
48	19.83	1.049	0.076	0.125	0.083	0.093
4 T	17.19	0.940	0.081	0.113	0.070	0.093
7	17.02	0.723	0.073	0.117	0.070	0.100
10	19.34	0.884	0.099	0.131	0.089	0.083
18	20.16	1.038	0.087	0.135	0.089	0.107
				Leermenge		0.102

TAB. 29 : VERSUCH IX, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten, BALB/c männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	24.29	1.092	0.095	0.167	0.095	0.102
30	23.71	1.022	0.099	0.187	0.088	0.095
180	23.59	0.898	0.074	0.158	0.085	0.107
24 h	23.65	1.147	0.106	0.165	0.093	0.079
3 T	21.43	0.875	0.107	0.153	0.087	0.074
8	22.96	1.035	0.099	0.174	0.092	0.126
13	27.86	1.530	0.109	0.247	0.119	0.110
15	23.97	1.081	0.100	0.205	0.103	0.087
				Leermenge		0.104

TAB. 30 : VERSUCH X, Präparation und Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung der gewaschenen Erythrozyten, BALB/c weiblich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	16.95	0.774	0.068	0.109	0.075	0.087
30	16.88	0.788	0.088	0.102	0.071	0.097
60	17.29	0.785	0.070	0.108	0.077	0.104
180	16.76	0.741	0.073	0.089	0.071	0.086
24 h	18.40	0.927	0.097	0.100	0.079	0.099
48	16.80	0.799	0.099	0.101	0.072	0.098
3 T	16.91	0.779	0.064	0.106	0.071	0.099
6	16.65	0.893	0.095	0.103	0.070	0.108
10	18.28	1.028	0.103	0.124	0.071	0.101
				Leermenge		0.091

TAB. 31 : VERSUCH XI, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A, BALB/c weiblich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	16.02	0.871	0.078	0.104	0.064	0.065
30	14.89	0.655	0.059	0.086	0.063	0.082
60	15.25	0.771	0.065	0.090	0.064	0.068
120	15.65	0.852	0.101	0.085	0.065	0.098
24 h	15.78	0.838	0.111	0.087	0.062	0.100
48	17.62	0.980	0.118	0.109	0.076	0.099
3 T	17.12	0.971	0.121	0.123	0.081	0.128
5	18.79	0.979	0.140	0.129	0.086	0.109
9	18.64	1.086	0.115	0.126	0.081	0.103
				Leermenge		0.100

TAB. 32 : VERSUCH XII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 4-tägiger Lagerung in Puffer A, BALB/c weiblich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	18.79	0.898	0.083	0.125	0.080	0.110
30	16.72	0.795	0.092	0.098	0.069	0.099
60	17.98	0.881	0.086	0.110	0.071	0.132
180	17.82	0.969	0.102	0.116	0.079	0.103
24 h	19.85	1.010	0.095	0.130	0.079	0.108
48	16.72	0.781	0.104	0.098	0.068	0.100
6 T	18.88	0.965	0.103	0.131	0.083	0.114
10	16.95	0.791	0.091	0.109	0.076	0.100
				Leermenge		0.096

TAB. 33 : VERSUCH XIII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie, BALB/c männlich, NMRI männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
BALB/c						
0 min	19.20	0.837	-	0.175	0.089	0.110
180	17.50	0.848	-	0.142	0.082	0.118
24 h	17.02	0.845	-	0.139	0.077	0.102
3 T	19.98	0.844	-	0.170	0.084	0.101
9	17.82	0.760	-	0.149	0.088	0.081
NMRI						
0 min	28.66	1.375	-	0.198	0.115	0.077
24 h	32.51	1.727	-	0.226	0.115	0.116
9 T	31.63	1.479	-	0.205	0.120	0.090
				Leermenge		0.128

TAB. 34 : VERSUCH XIV, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie, BALB/c männlich

Zeit	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
0 min	25.95	1.426	-	0.225	0.119	0.101
0	21.84	1.343	-	0.190	0.112	0.133
30	25.49	1.284	-	0.192	0.112	0.116
120	25.38	1.251	-	0.211	0.106	0.090
24 h	26.87	1.438	-	0.219	0.112	0.108
3 T	24.40	1.260	-	0.207	0.111	0.060
8	27.35	1.542	-	0.238	0.122	0.102
14	27.51	1.763	-	0.251	0.127	0.113
24	25.46	1.343	-	0.221	0.100	0.113
				Leermenge 1		0.125
				Leermenge 2		0.100

TAB. 35 : VERSUCH XV, i.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung

	KG	Leber	Milz	Niere	Herz	Dosis
NMRI	40.21	1.438	0.188	0.355	0.203	0.110
BALB/c1	25.20	1.139	0.093	0.194	0.105	0.073
				Leermenge 1		0.060
				Leermenge 2		0.060
BALB/c2	25.31	1.336	0.081	0.172	0.100	0.050
BALB/c3	26.82	1.473	0.088	0.213	0.112	0.095
				Leermenge 1		0.050
				Leermenge 2		0.070

TEIL VI

Zählraten (Counts per minute, c.p.m.)

Für Leber, Milz, Niere und Herz sind jeweils 2 Werte angegeben, wobei der obere der gemessenen Zählrate, der untere der rechnerisch bestimmten effektiven Organanreicherung in c.p.m. entspricht.

TAB. 36 : VERSUCH I, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Blut
0 min	35256 7874	1046 134	21841 16192	2393 467	11699
15	19583 2178	886 183	7070 3949	1734 377	6765
30	17531 5138	1029 448	5975 3559	1372 611	4838
60	14391 2695	1391 863	3938 1931	1030 437	4690
120	13738 2906	887 451	5397 3255	941 197	4003
180	8665 1649	1284 11	1704 474	467 87	2572
24 h	24015 19052	2009 1788	2235 1319	835 467	2176
48	34567 31459	4161 3883	2021 1360	767 566	1142
Leerwert					665871

TAB. 37 : VERSUCH II, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Blut
0 min	13371 3376	737 299	17045 14726	1921 1114	4777
30	6310 1462	379 158	2162 1265	857 428	2680
60	7444 2863	321 157	1649 956	467 217	1778
120	6396 1456	431 203	2201 1332	558 240	2063
180	4381 2132	311 214	1093 622	409 218	1180
24 h	11417 10061	871 806	723 477	364 268	590
48	10649 10506	879 871	452 420	135 125	79
4 T	10965 10855	1189 1183	419 397	178 170	60
7	10650 10616	1054 1052	361 355	183 181	23
10	13544 13502	1068 1067	420 418	198 195	19
Leerwert					158293

TAB. 38 : VERSUCH III, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung
BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Blut
0 min	9164 2087	500 0	4770 3414	1352 718	6401
30	7201 3599	353 30	1574 796	792 449	3017
60	5313 2532	369 99	1323 707	464 197	2094
120	7086 4975	333 121	940 523	563 353	1907
24 h	10632 10041	709 640	691 537	235 157	502
3 T	11180 11131	991 977	509 479	167 161	34
6	3687 3684	293 291	71 70	22 21	5
9	9115 9107	686 685	250 248	108 107	6
Leerwert					179864

TAB. 39 : VERSUCH IV, Injektion 125-I PVP beladener
menschlicher Trägererythrozyten, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	19325 13850	850 537	853 0	412 79	2488	19900
15	21964 17434	2621 2327	476 0	150 0	2806	8111
30	36870 28338	5128 4670	369 0	182 0	5268	11566
60	21650 19239	2795 2661	158 0	50 0	657	8822
120	17074 15013	896 792	149 4	36 0	600	8511
180	21761 19711	1050 974	105 0	27 0	661	7486
4 T	20334 20018	1673 1671	69 9	25 12	0	00
Leerwert					122265	

TAB. 40 : VERSUCH V, Injektion 125-I PVP beladener Erythrozytenschatten, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	12628 0	3326 2600	2030 8	748 0	5983	1995
15	19793 7100	14654 14018	1629 0	557 0	6127	942
30	23069 14591	16941 16495	1395 0	513 5	3552	913
60	52511 39136	30444 29779	1446 0	822 31	6586	972
120	35846 27291	19913 19416	477 0	213 0	3404	663
180	21058 15643	18476 18223	329 0	246 0	2267	577
4 T	26117 23155	28343 28207	470 0	156 0	1613	2
Leerwert					287359	

TAB. 41 : VERSUCH VI, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	12287 3388	2005 1485	2194 364	798 376	4704	931
15	8337 5598	17330 17184	883 326	414 258	1206	525
30	14299 12743	27907 27816	648 330	299 197	497	461
60	16893 14275	30680 30556	420 0	293 160	1177	199
120	20012 18666	41176 41117	415 200	342 285	453	104
180	20463 19384	27655 27605	240 54	153 98	447	126
24 h	20483 18800	32392 32327	193 0	54 4	674	96
Leerwert					156639	

TAB. 42 : VERSUCH VII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten (Alle Waschgänge bei 20 Grad Celsius und 670 x g), BALB/c männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	10146 2178	2741 2213	2001 324	739 0	10351	2196
30	24593 21267	16705 16091	1515 743	373 108	3773	692
60	14039 11847	6956 6839	477 0	157 0	2595	197
120	16024 13304	11701 11593	531 0	189 0	2594	263
24 h	13190 11198	11831 11747	266 0	104 0	2140	97
48	15695 13993	19570 19463	200 0	113 0	1644	115
4 T	21039 18854	20247 20112	147 0	63 0	2171	14
6	24816 23272	37202 37139	172 0	41 0	1604	9
9	10755 10291	11600 11591	91 0	40 0	691	0
Leerwert					184811	

TAB. 43 : VERSUCH VIII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	11343 0	1201 434	2197 193	953 31	19185	2496
30	22667 16826	29606 29113	1008 16	547 142	11319	857
60	24209 12215	45129 44413	1376 0	426 0	17234	704
120	23267 13671	46513 45892	789 0	483 0	14785	404
24 h	38711 31315	70104 69556	674 0	249 0	11244	275
48	31458 24551	62074 61661	715 0	215 0	9498	96
4 T	35199 30330	57758 57415	466 0	192 0	7522	39
7	29738 26443	47625 47356	427 0	177 0	6620	37
10	33008 30443	47298 47070	314 0	168 0	4134	12
18	37284 35515	48394 48285	323 0	105 0	2503	16
Leerwert					221885	

TAB. 44 : VERSUCH IX, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten, BALB/c männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	19750 0	7101 5427	4847 155	1825 149	58112	3180
30	40853 30008	68258 67352	4638 1848	1236 430	28773	3012
180	27158 16263	61865 61088	2106 0	770 0	35441	1013
24 h	35337 28681	61980 61470	1176 0	297 0	16558	866
3 T	29856 25837	50478 50052	1288 333	284 0	13776	96
8	54822 47740	99074 98488	1421 0	388 0	20471	84
13	41825 37237	63325 63042	1509 482	344 15	8595	57
15	36924 33725	51281 51024	746 0	231 0	8930	20
					Leerwert	403295

TAB. 45 : VERSUCH X, Präparation und Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung der gewaschenen Erythrozyten, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	6766 1108	953 524	1001 0	397 0	3376	1323
30	19678 16851	18379 18107	434 0	140 0	1887	439
180	17531 14372	20904 20705	188 0	93 0	1827	224
24 h	18387 15780	40057 39822	169 0	170 0	1764	64
48	16622 15095	27353 27190	105 0	62 0	1225	24
3 T	18385 17231	39062 38980	165 0	66 0	955	17
6	15677 14509	56978 56871	175 0	64 0	849	12
10	20565 20106	36854 36814	150 0	54 0	305	0
					Leerwert	103258

TAB. 46 : VERSUCH XI, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	4453 1434	1290 1057	667 149	165 0	2547	558
30	6100 4007	8690 8527	393 0	195 1	2364	508
120	13592 13151	13766 13721	145 64	70 21	399	85
24 h	13396 12959	14550 14500	126 43	78 30	381	105
48	11226 10967	17648 17621	94 34	42 5	246	11
3 T	17579 16986	27691 27627	177 53	129 66	559	8
5	13987 13413	16745 16674	98 0	44 0	543	0
9	11380 10845	15965 15916	110 4	39 0	431	0
					Leerwert	68054

TAB. 47 : VERSUCH XII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach 4-tägiger Lagerung in Puffer A, BALB/c weiblich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma
0 min	15313 0	2891 1532	2420 0	776 0	16275	2198
60	28650 13366	66806 65518	1090 0	408 0	16317	583
180	30732 22553	62387 61643	513 0	398 0	7858	484
24 h	34945 29898	86793 86384	424 0	131 0	4756	122
48	45314 42040	80604 80228	245 0	101 0	4032	62
6 T	48704 47890	77119 77044	337 0	66 0	816	24
10	34506 34014	78656 78605	275 0	57 0	628	21
					Leerwert	248550

TAB. 48 : VERSUCH XIII, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie, BALB/c männlich, NMRI männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma

BALB/c						

0 min	4574	--	1824	437	4909	654
	2410	--	1204	220		
180	14031	--	773	358	13535	320
	8602	--	0	0		
24 h	23919	--	826	235	9270	228
	20216	--	0	0		
3 T	19412	--	748	154	4548	22
	17635	--	234	0		
9	12746	--	427	132	5578	21
	10809	--	0	0		
14	14727	--	376	103	3866	11
	13107	--	0	0		
NMRI						

0 min	6157	--	911	261	6630	703
	1510	--	0	0		
24 h	28571	--	1015	234	6779	228
	22975	--	7	0		
9 T	25532	--	596	187	6575	28
	21042	--	0	0		
					Leerwert	128317

TAB. 49 : VERSUCH XIV, Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie, BALB/c männlich

Zeit	Leber	Milz	Niere	Herz	Erys	Plasma

0 min	6298	--	1702	470	16587	159
	0	--	59	0		
0	7906	--	2015	775	24194	301
	0	--	0	27		
30	14016	--	1211	643	19716	217
	5954	--	0	55		
120	12972	--	566	430	16648	51
	6389	--	0	33		
24 h	20204	--	1036	290	13430	75
	14094	--	0	0		
3 T	11818	--	367	120	7498	26
	8849	--	0	0		
8	26547	--	612	202	8179	18
	22581	--	0	0		
14	36862	--	501	133	7959	0
	32432	--	0	0		
24	32028	--	424	82	6803	0
	29160	--	0	0		
					Leerwert 1	133547
					Leerwert 2	110142

TAB. 50 : VERSUCH XV, I.v.-Injektion von 125-I PVP Lösung

	Blut	Leber	Milz	Niere	Herz
NMRI	29879	46047	4665	58429	8156
BALB/c 1	31754	38138	3477	34937	4182
			Leerwert 1		684876
			Leerwert 2		704305
BALB/c 2	23646	33271	1502	12058	2924
BALB/c 3	40778	68393	3285	29737	7848
			Leerwert 1		613827
			Leerwert 2		944781

7. A B B I L D U N G E N

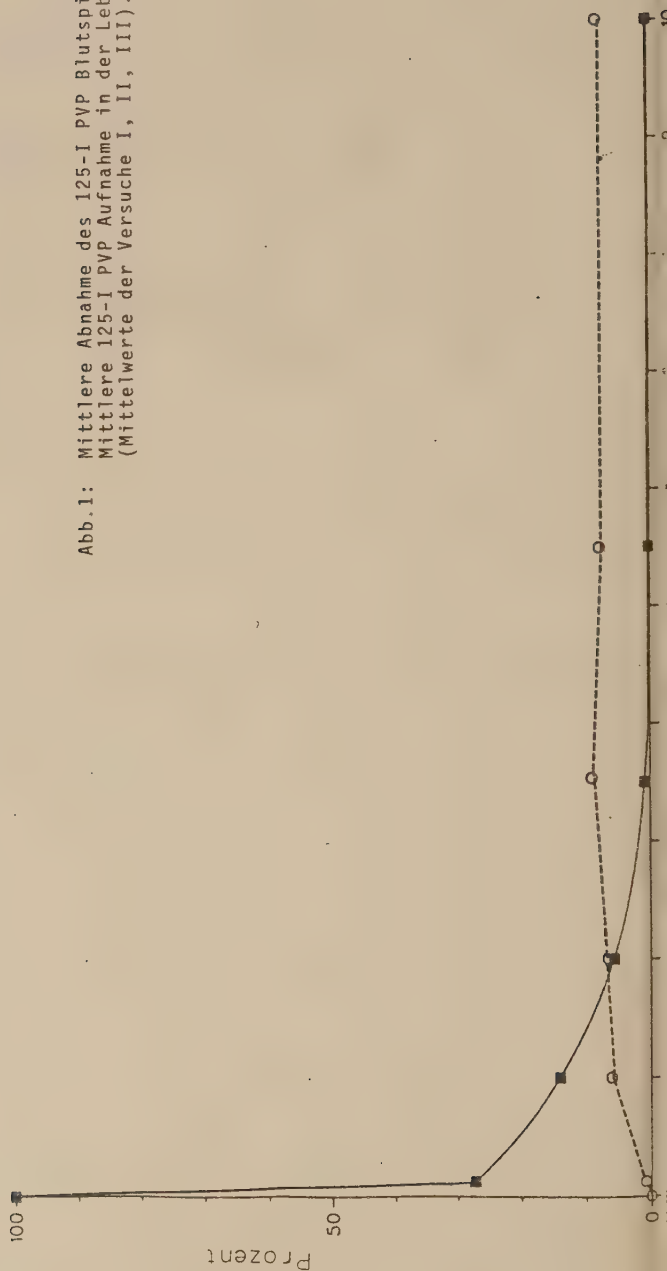


Abb. 1: Mittlere Abnahme des 125-I PVP Blutspiegels (■)
 Mittlere 125-I PVP Aufnahme in der Leber (O)
 (Mittelwerte der Versuche I, II, III).

Abb. 2: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten
 (% des Ausgangswertes).
 VERSUCH V, NMRI männlich

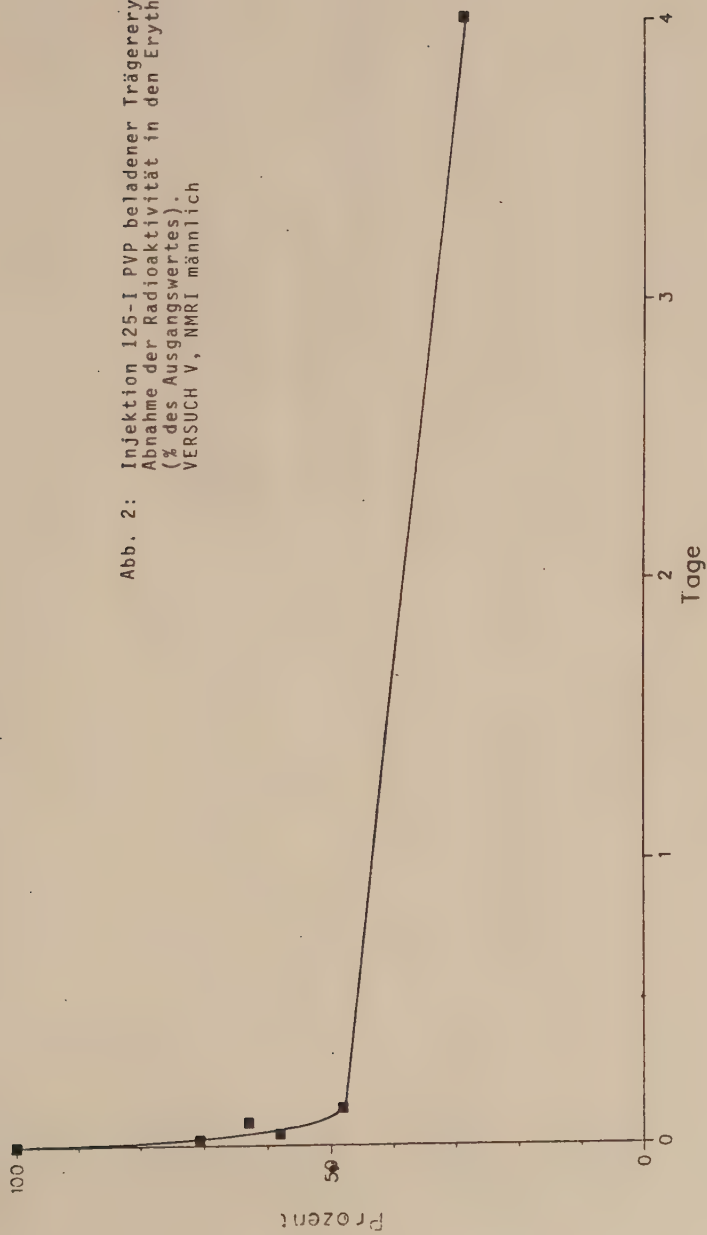


Abb. 3: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 125-I PVP Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
 (% der Gesamtdosis).
 VERSUCH V, NMRI männlich

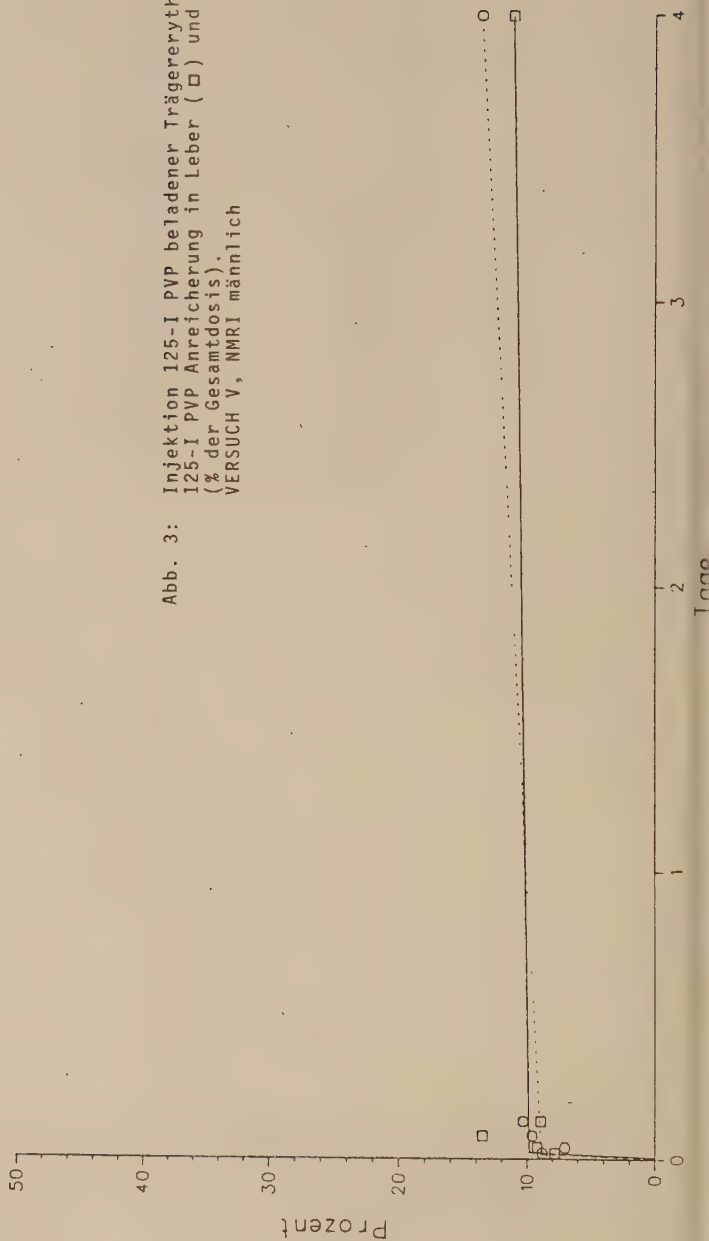


Abb. 4: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A:
Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten
(% des Ausgangswertes).
VERSUCH VI, NMRI männlich

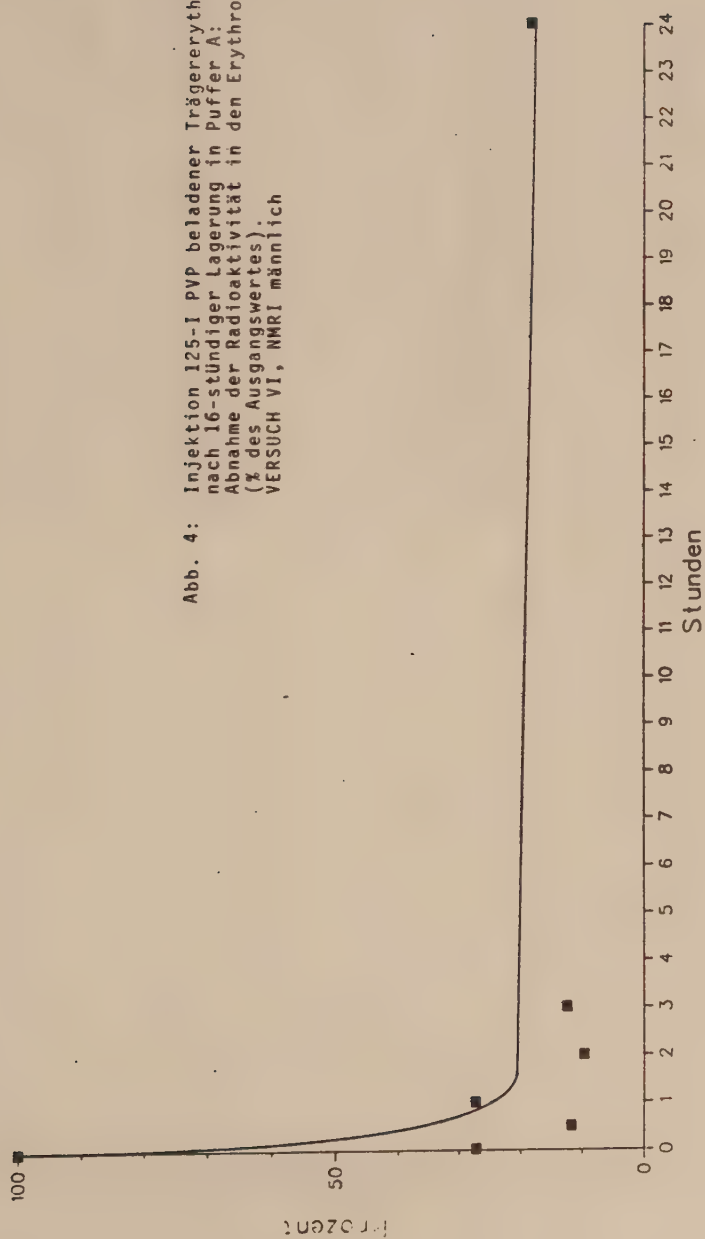


Abb. 5: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A:
125-I PVP Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
(% der Gesamtdosis).
VERSUCH VI, NMRI männlich

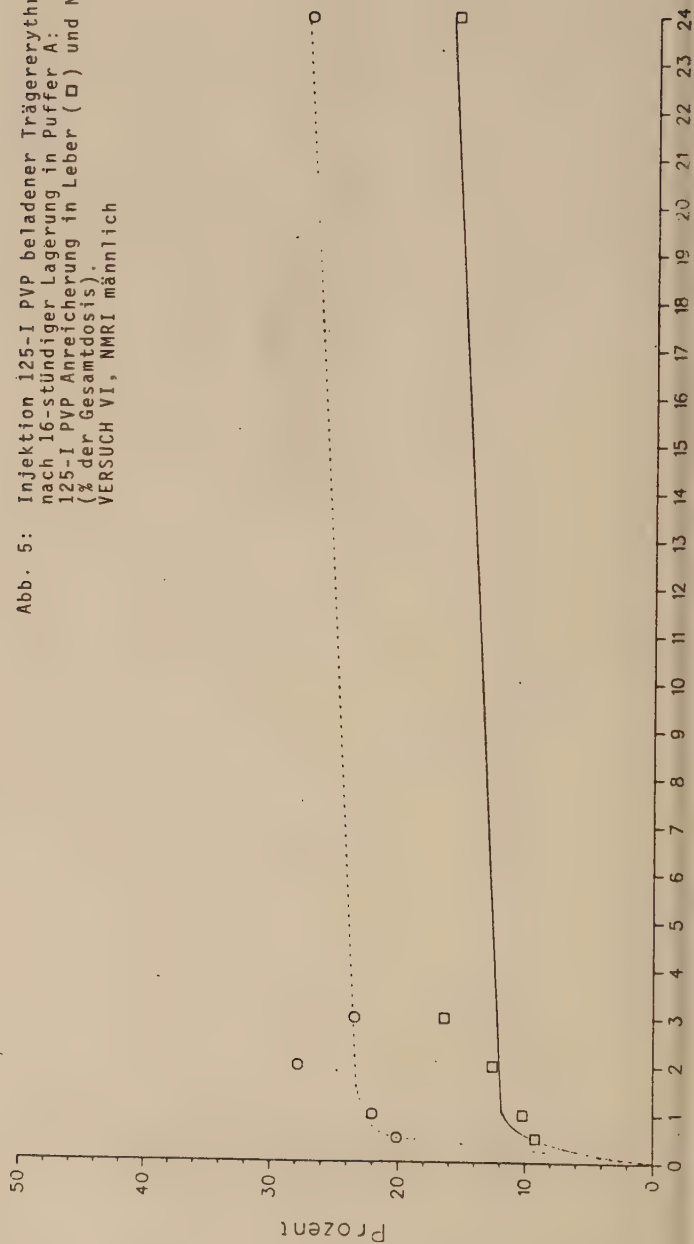


Abb. 6: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
(Waschgänge bei 20 C und 670 x g): Abnahme der
Radioaktivität in den Erythrozyten in % des Aus-
gangswertes.
VERSUCH VII, BALB/c männlich

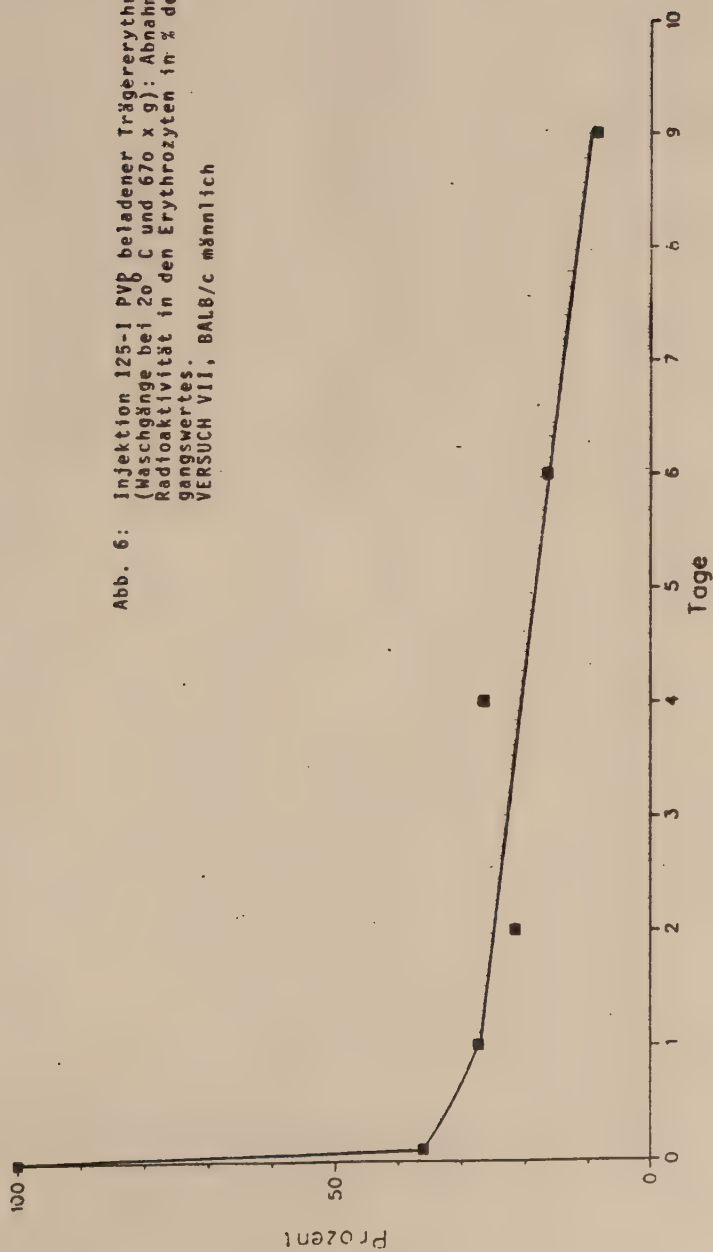


Abb. 7: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
(Waschgänge bei 20^o C und 670 x g); 125-I PVP
Anreicherung in Leber (□) und Milz (○) in % der
Gesamtdosis. VERSUCH VII, BALB/c männlich

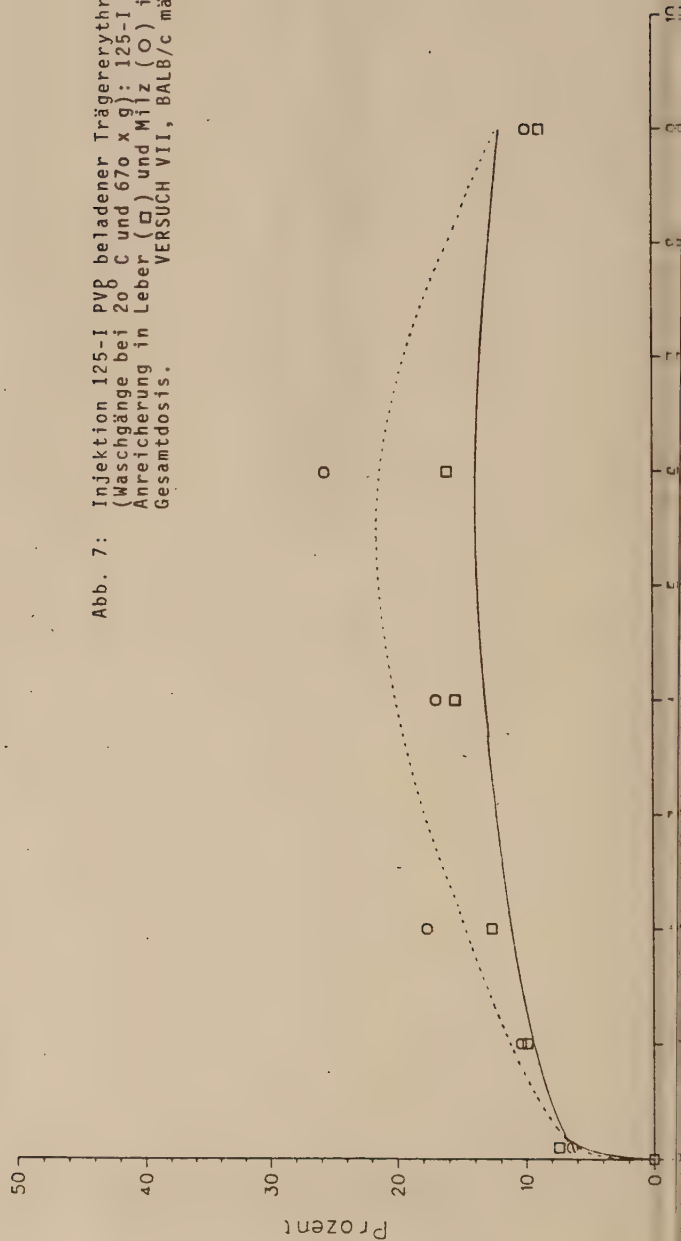


Abb. 8: Injektion $^{125}\text{-I}$ PVP beladener Trägererythrozyten:
 Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten
 (% des Ausgangswertes).
 VERSUCH VIII, BALB/c weiblich

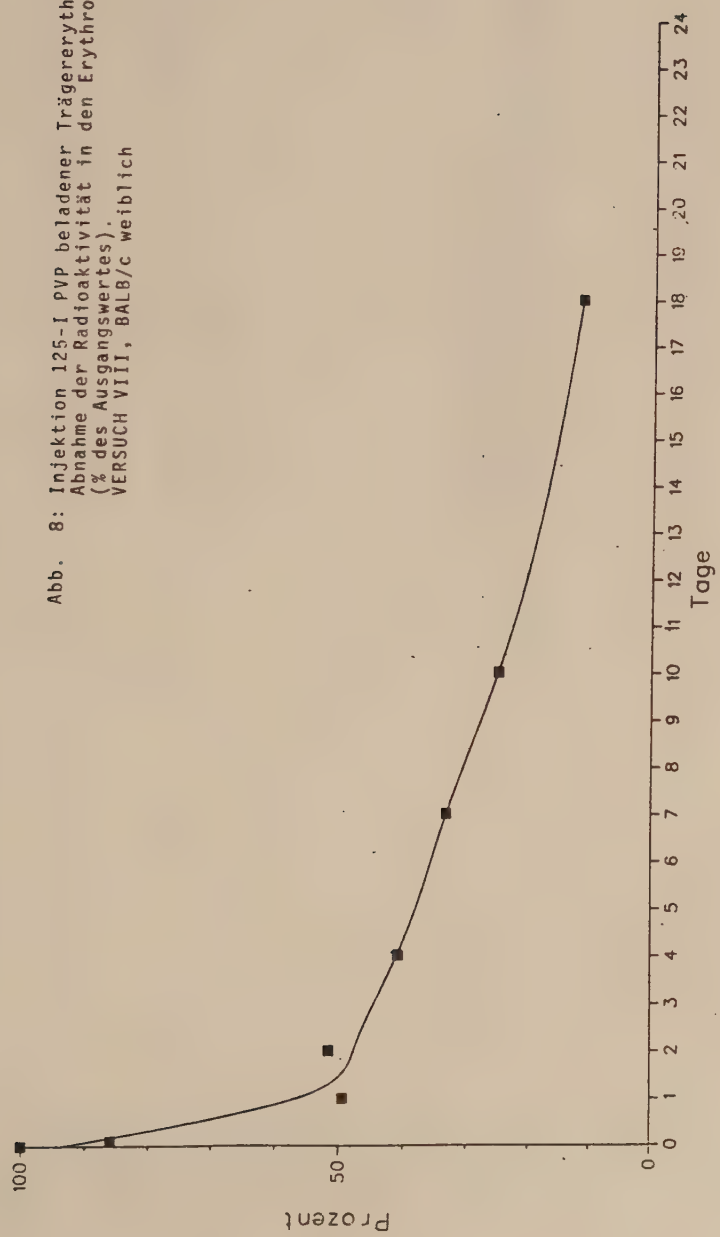


Abb. 9: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 125-I PVP Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
 (% der Gesamtdosis).
 VERSUCH VIII, BALB/c weiblich

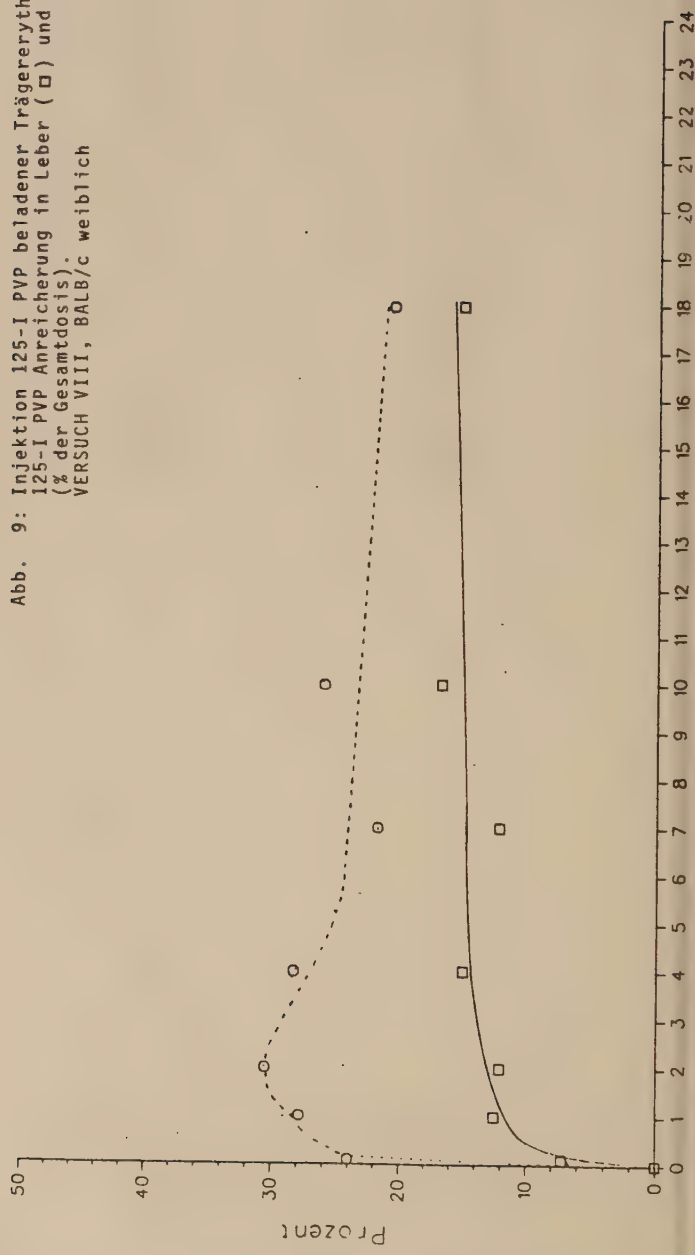


Abb. 1a: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten in
 % des Ausgangswertes.
 VERSUCH IX, BALB/c männlich

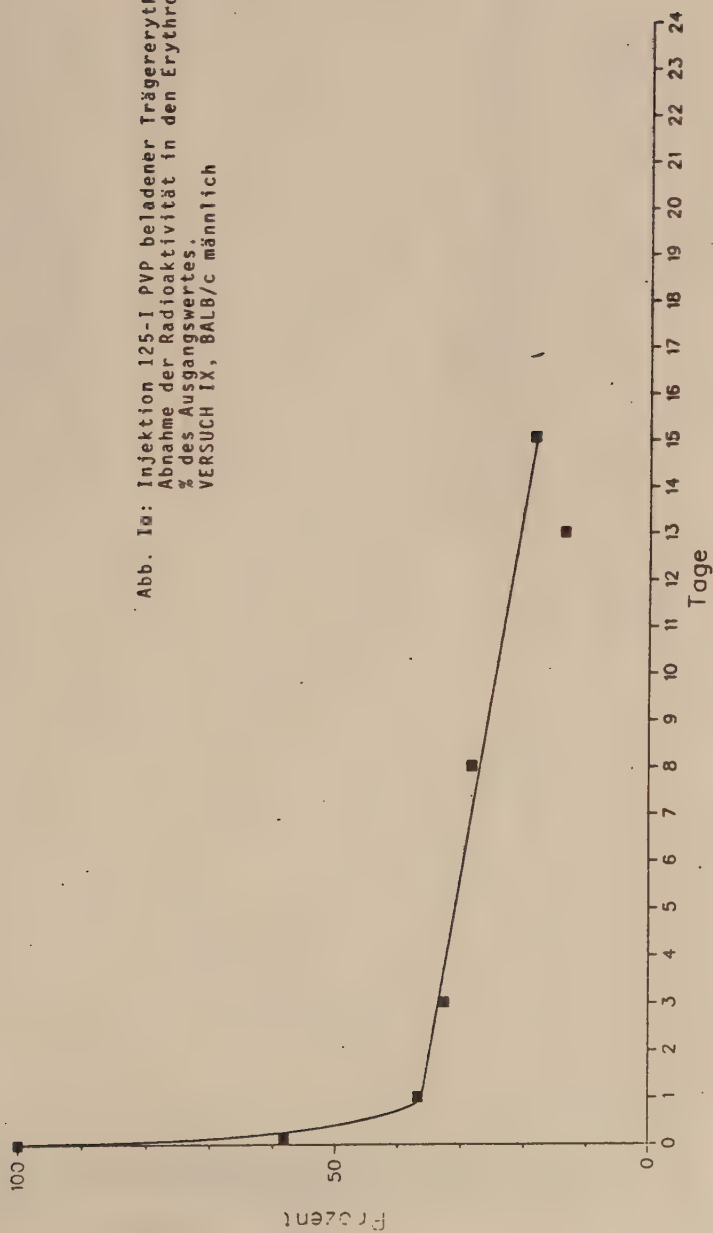


Abb. 11: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 125-I PVP-Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
 in % der Gesamtdosis.
 VERSUCH IX, BALB/c männlich

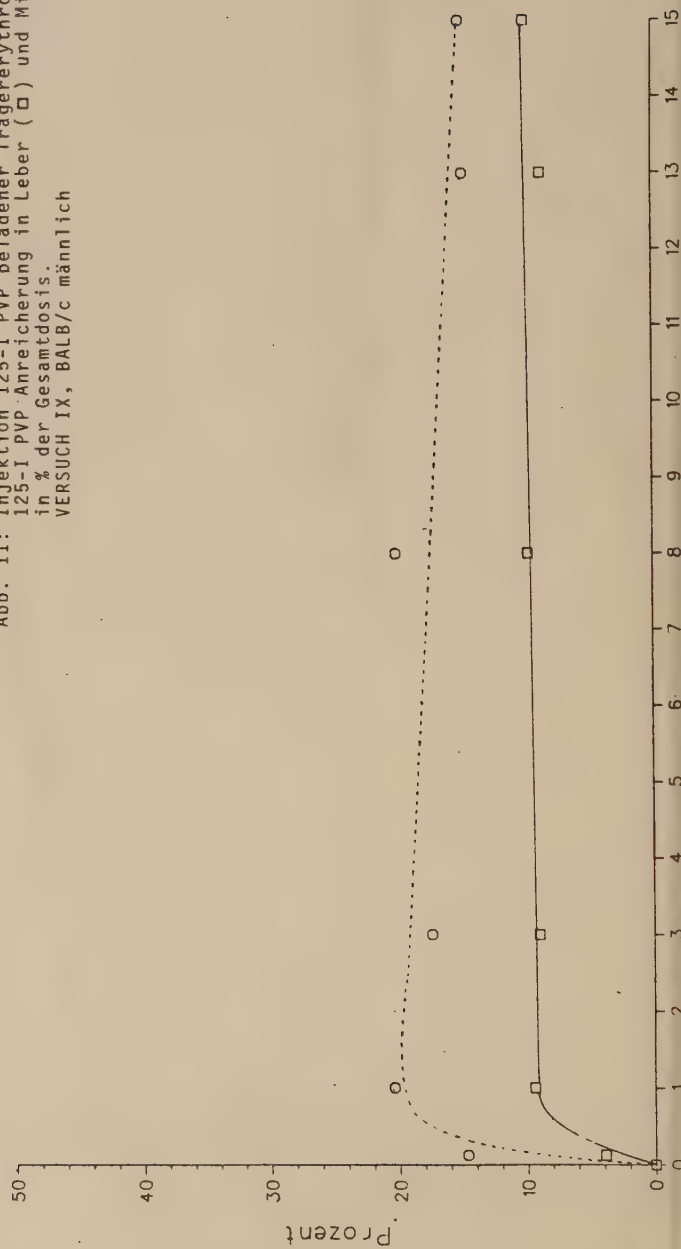


Abb. 12: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten in
 % des Ausgangswertes
 (O) Präparation der Trägererythrozyten nach 16 -
 stündiger Lagerung der Erythrozyten in Puffer A
 (□) Injektion der Trägererythrozyten nach 16-stün-
 diger Lagerung in Puffer A
 (Δ) Injektion der Trägererythrozyten nach 4-tägiger
 Lagerung in Puffer A.

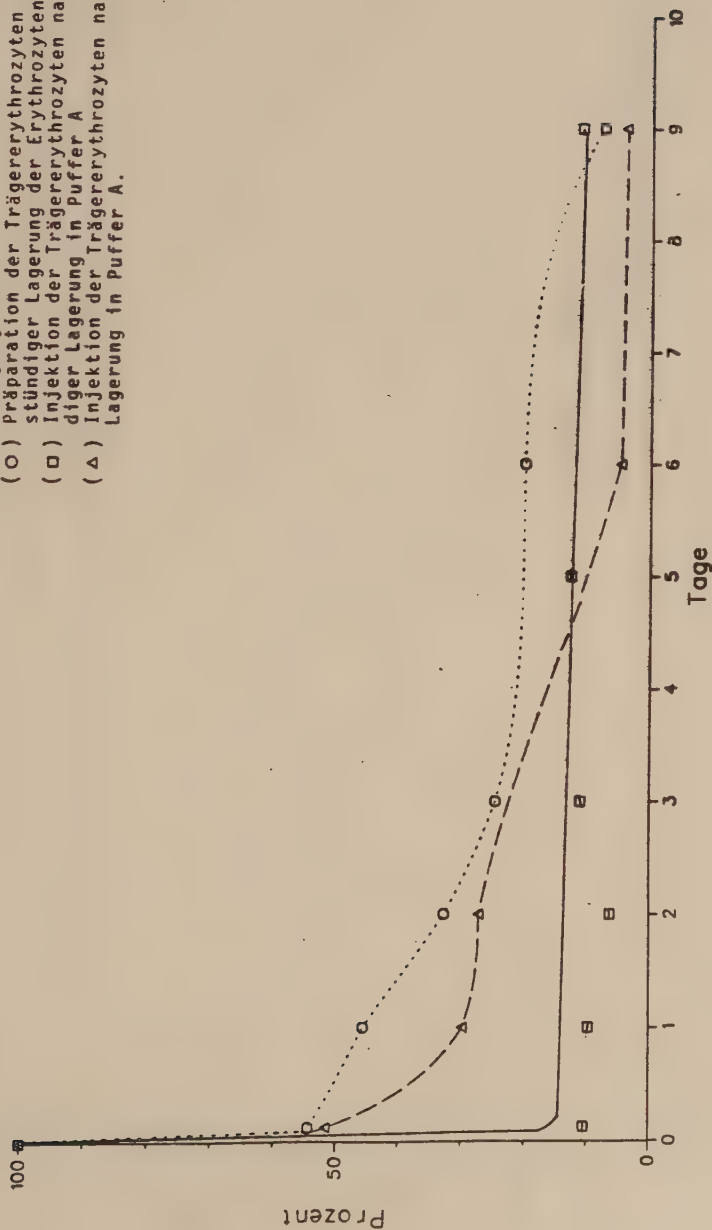


Abb. 13: Präparation und Injektion von Trägererythrozyten
 nach 16-stündiger Lagerung der Erythrozyten:
 125-I PVP Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
 (% der Gesamtdosis).....
 VERSUCH X, BALB/c weiblich

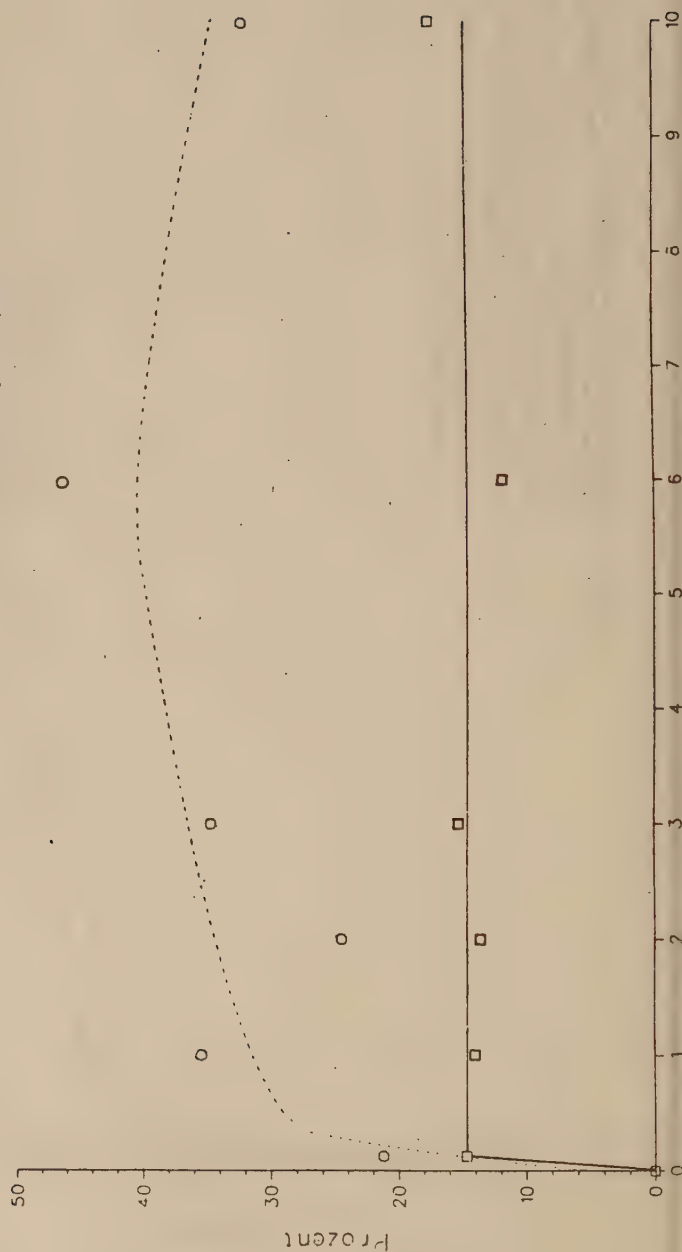


Abb. 14: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
nach 16-stündiger Lagerung in Puffer A:
125-I PVP Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
(% der Gesamtdosis).
VERSUCH XI, BALB/c weiblich

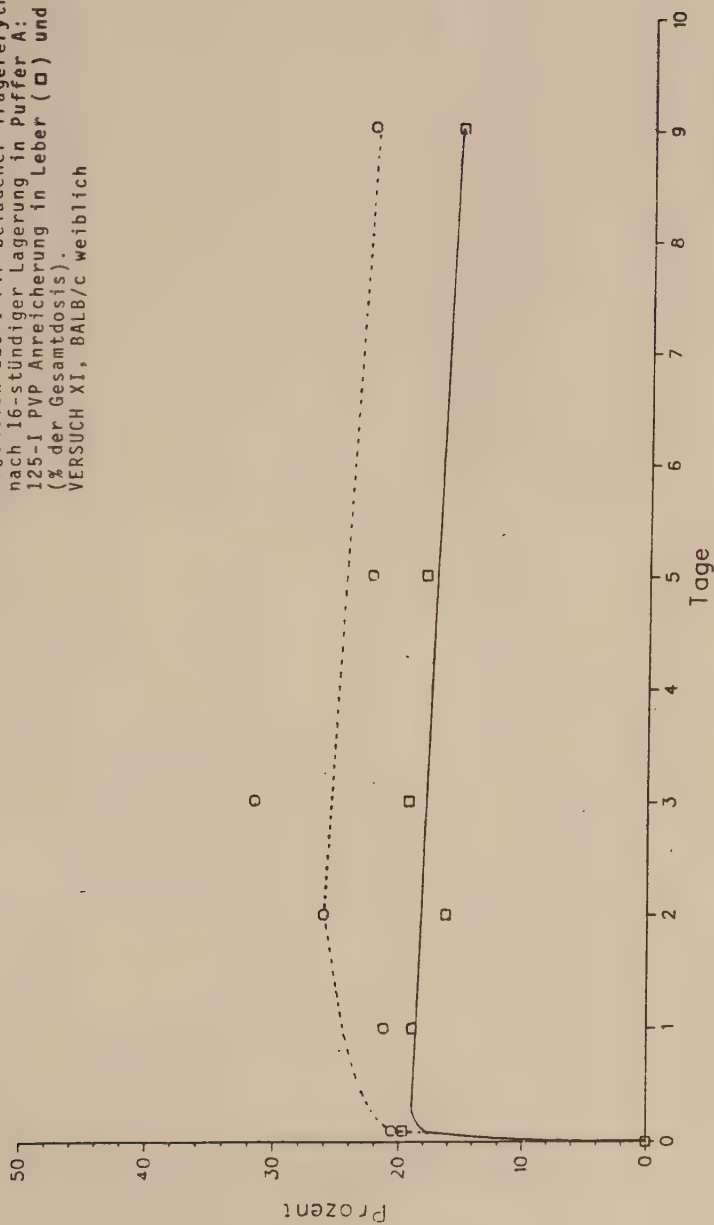


Abb. 15: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
nach 4-tägiger Lagerung in Puffer A:
125-I PVP Anreicherung in Leber (□) und Milz (○)
(% der Gesamtdosis).
VERSUCH XII, BALB/c weiblich

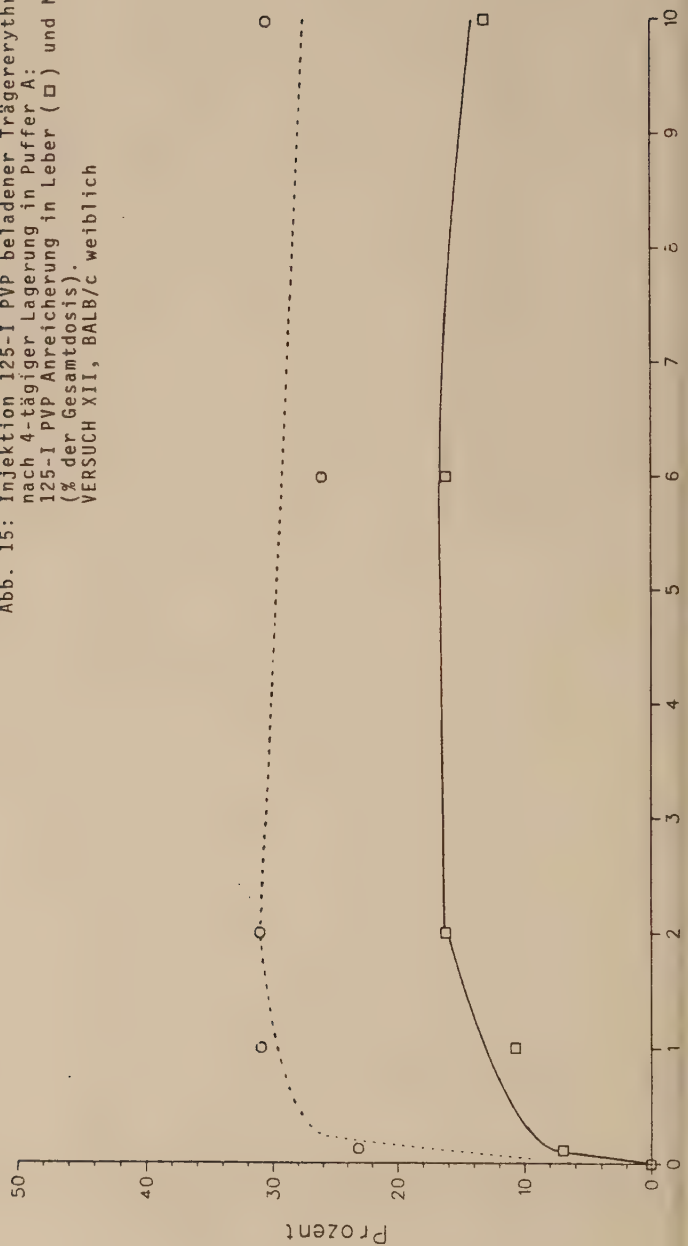


Abb. 16: Injektion $^{125}\text{-I}$ pvp beladener Trägererythrozyten nach Splenektomie: Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten (% des Ausgangswertes).
VERSUCH XIV, BALB/c männlich

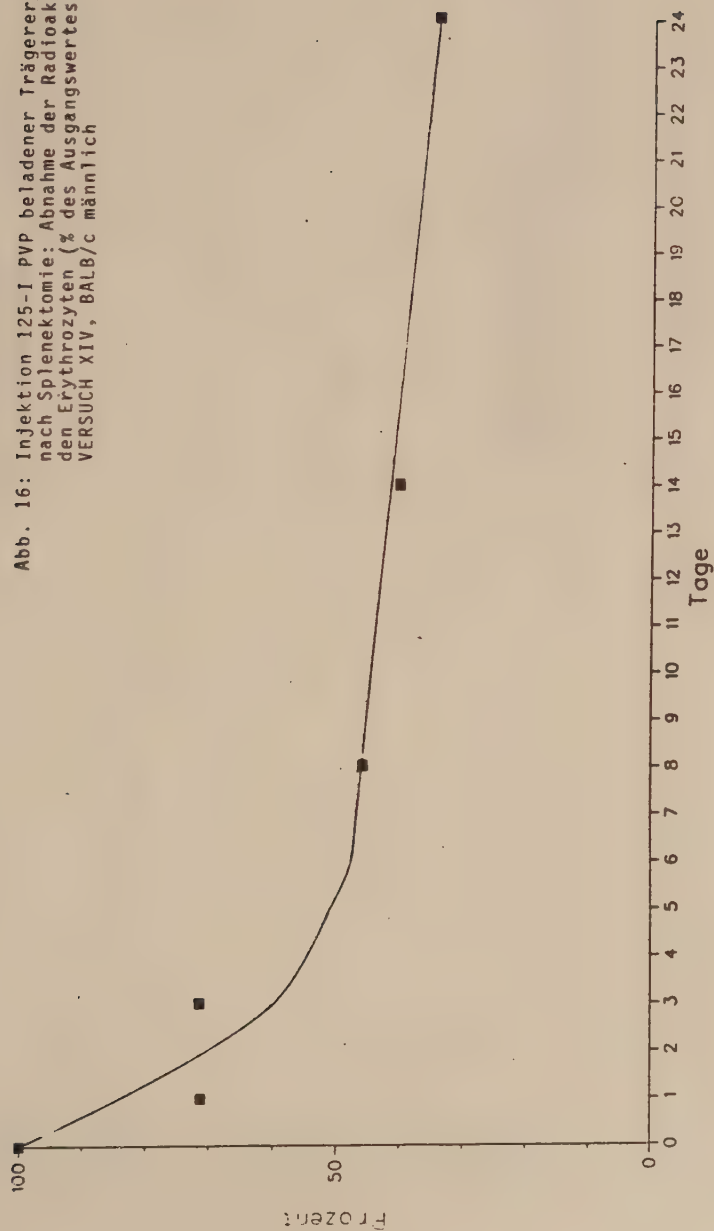


Abb. 17: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten
nach Splenektomie: 125-I PVP Anreicherung in der
Leber (% der Gesamtdosis)
VERSUCH XIV, BALB/c männlich

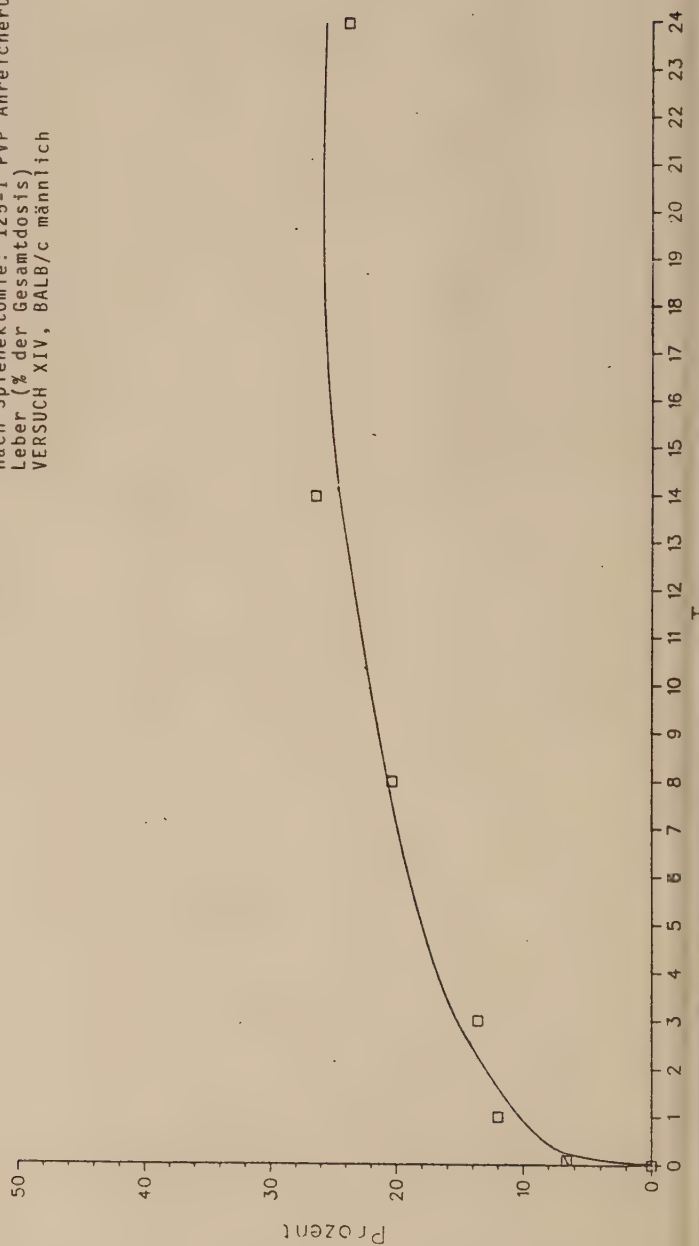


Abb. 18: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten in
 % des Ausgangswertes.
 (■) ohne Splenektomie, VERSUCH VIII
 (○) nach Splenektomie, VERSUCH XIV

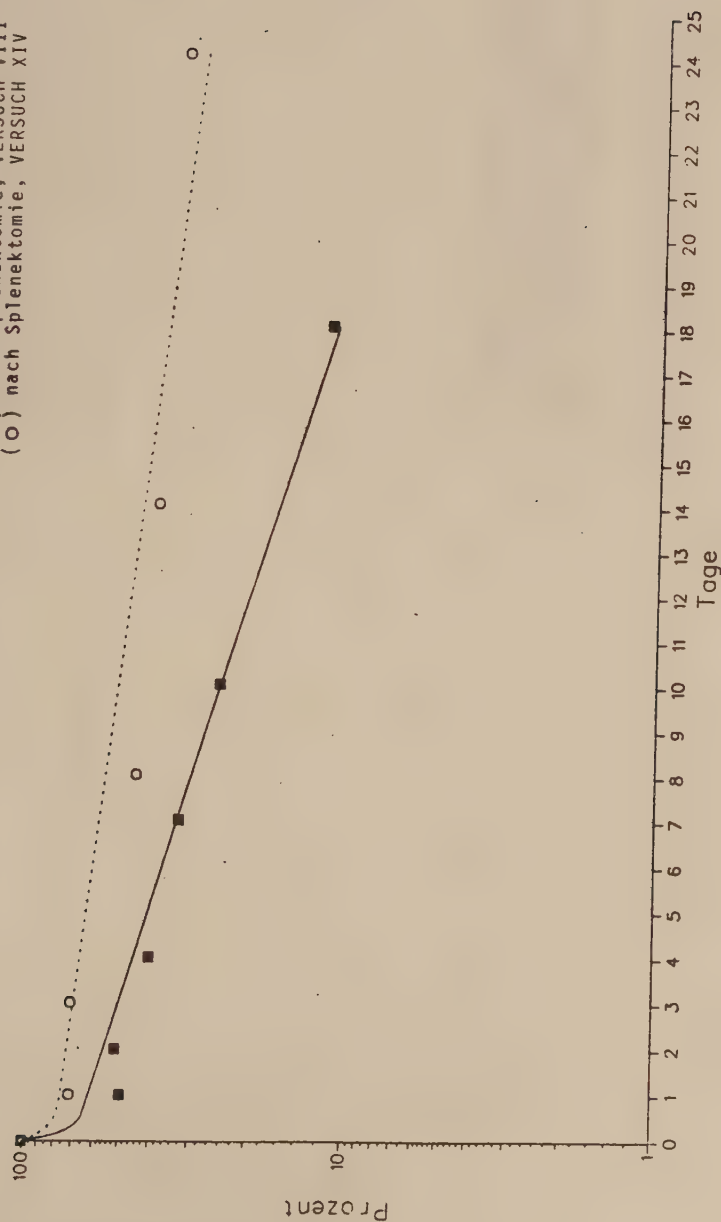


Abb. 19: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten :
 125-I PVP Anreicherung in Leber und Milz innerhalb
 der ersten 3 Stunden nach Injektion.
 (■) Milz, Mittelwert der Versuchsreihen V-XII
 (○) Leber, Mittelwert der Versuchsreihen V-XII
 (Δ) Leber nach Splenektomie, Versuch XIV

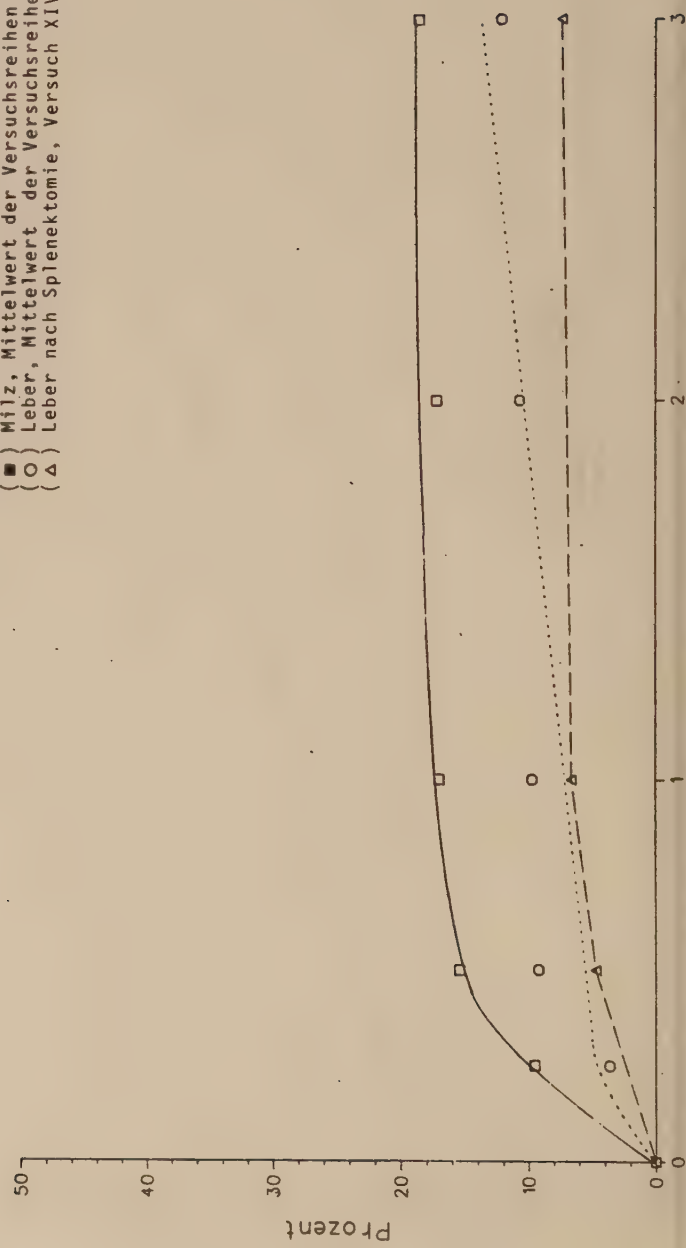


Abb. 20: Injektion 125-I PVP beladener Trägererythrozyten:
 125-I PVP Anreicherung in Leber und Milz. V-XII
 (■) Milz, Mittelwerte der Versuchsreihen V-XII
 (○) Leber, Mittelwerte der Versuchsreihen V-XII
 (Δ) Leber nach Splenektomie, Versuch XIV

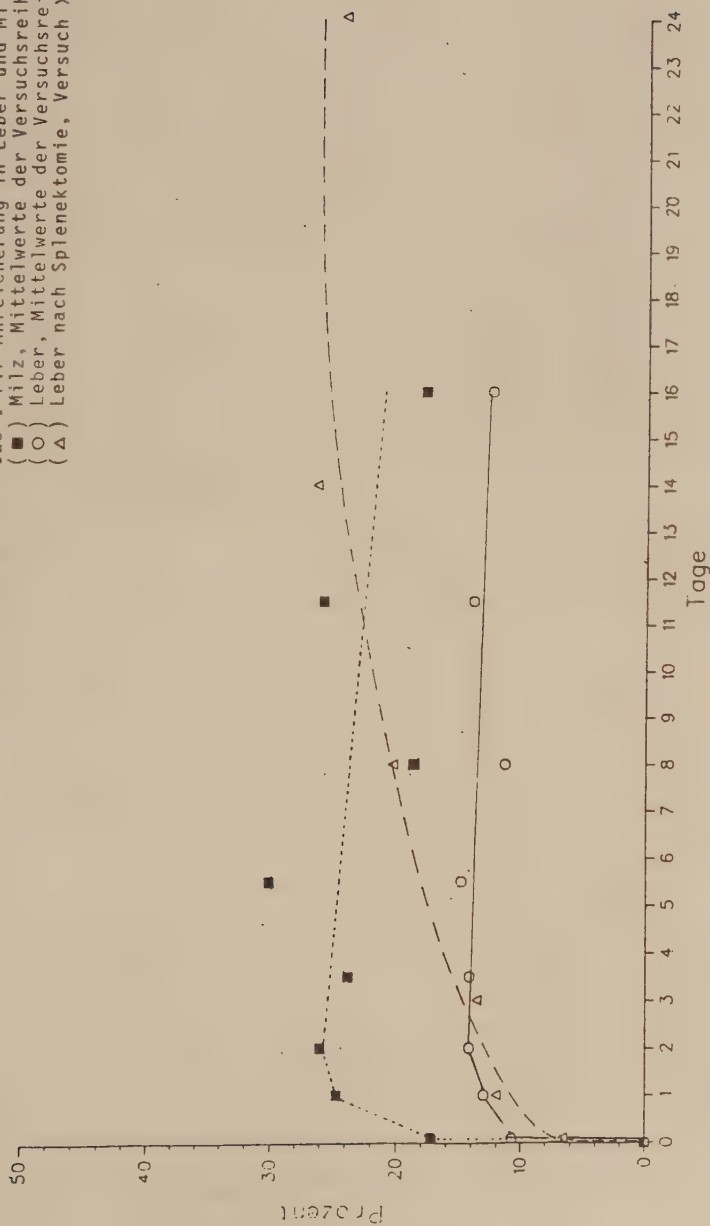


Abb. 21: Osmotische Resistenz normaler Mäuseerythrozyten:
 (□) unbehandelte Erythrozyten
 (○) nach 24-stündiger Inkubation in 10 mM Glucose
 (Δ) nach 24-stündiger Lagerung in Puffer A

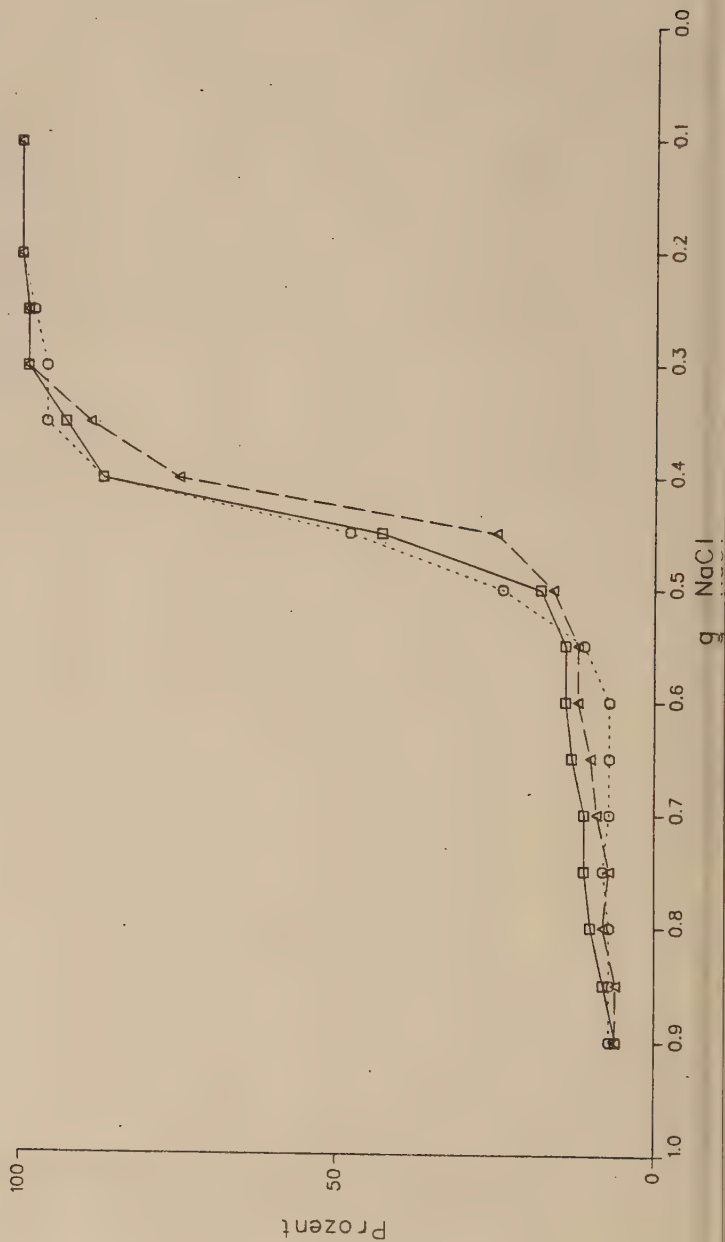
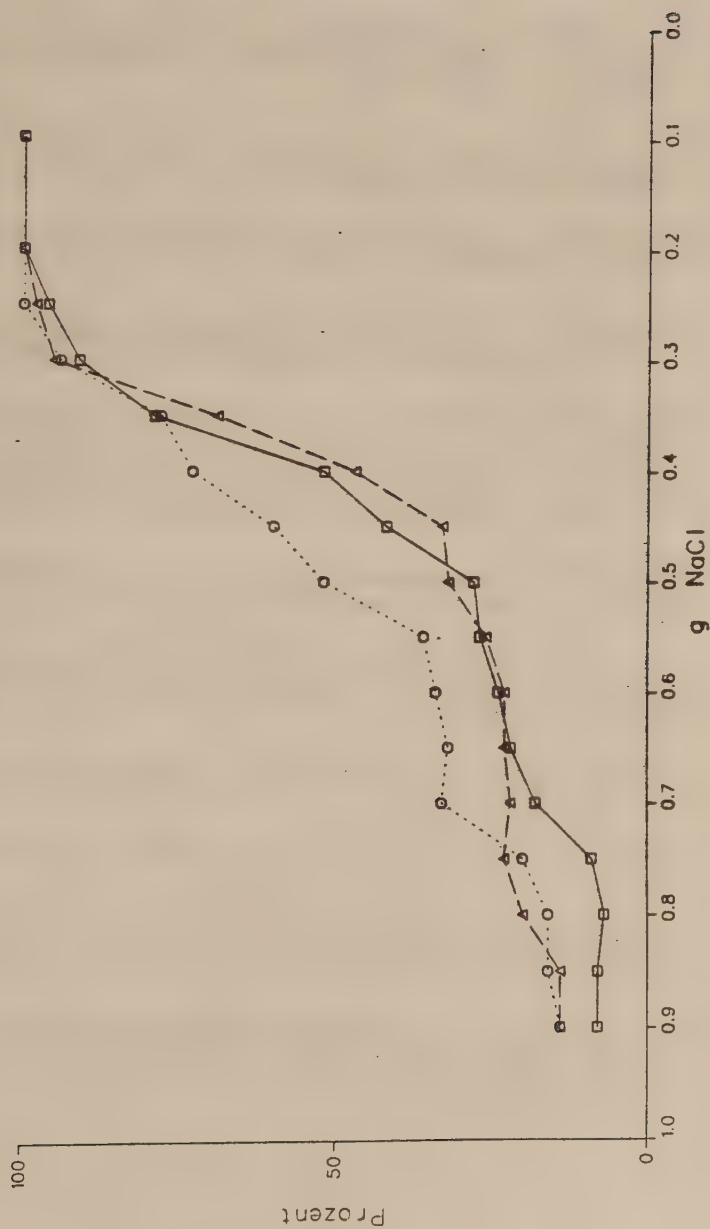


Abb. 22: Osmotische Resistenz von Trägererythrozyten:
 (□) Waschgänge bei 40° C und 500 x g
 (○) Waschgänge bei 200° C und 670 x g
 (Δ) nach 24-stündiger Inkubation in Puffer A



L I T E R A T U R - V E R Z E I C H N I S

1. ALTMAN,P.L., DITTMER,D.L. (1971)
Respiration and Circulation. (Biological Handbooks),
Federation of American Societies for Experimental Biology,
Bethesda, Maryland, 380.
2. BAKER,R. (1967)
Entry of ferritin into human red cells during hypotonic
hemolysis. Nature, 215, 424
3. BAKER,R., GILLIS,N.R. (1968)
Osmotic hemolysis of chemically modified red blood cells.
Semin. Hematol. 5, 170
4. BALDUINI,C.L., SINIGAGLIA,F. (1978)
Behaviour of young and old desialylated rabbit erythrocytes
in vivo. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 1573.
5. BARTLETT,G.R. (1972)
Incubation of human red cells, after storage for 8 weeks in
ACD, with inosine + adenine and inosine + adenine + pyruvate;
effects on nucleotids and phosphorylated carbohydrate inter-
mediates. In Hemoglobin and Red Cell Structure and Function.
ed. Brewer, Plenum Press, New York, 479.
6. BEUTLER,E. (1975)
A Manual of biochemical Methods.In: Red Cell Metabolism. 2nd
ed., Grune and Stratton, New York, 149.
7. BEUTLER,E., DALE,G.L., GUINTO,E., KUHL,W. (1977)
Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: Preliminary
clinical trial of a new enzyme preparation. Proc.Nat.Acad.
Sci. 10, 4620.
8. BEUTLER,E., DALE,G.L., KUHL,W. (1977)
Enzyme replacement with red cells. N.Engl.J.Med. 296, 942.
9. BEUTLER,E. & DURON,O. (1965)
Effects of pH on preservation of red cell ATP. Transfusion 5,
17.
10. BILLAH,M.M., FINEAN,J., COLEMAN,R., MICHELL,R.H. (1976)
Preparation of erythrocyte ghosts by a Glycol-induced osmotic
lysis under isoionic conditions. Biochim.Biophys.Acta 433,
54.
11. BILLAH,M.M., FINEAN,J., COLEMAN,R., MICHELL,R.H. (1977)
Permeability characteristics of erythrocyte ghosts prepared
under isoionic conditions by a Glycol-induced osmotic lysis.
Biochim.Biophys.Acta 465, 515.

12. BISHOP,C. (1964)
Some in vitro effects of adenine added to stored blood.
Transfusion 4, 265.
13. BODEMANN,H., PASSOW,H. (1972)
Factors controlling the resealing of the membrane of human
erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. J.Membr.Biol.
8, 1
14. BRAMLEY,T.A., COLEMAN,R., FINEAN,J. (1971)
Chemical, enzymological and permeability properties of human
erythrocyte ghosts prepared by hypotonic lysis in media of
different osmolarities. Biochim.Biophys.Acta, 241, 752.
15. BROCK,D.J.H., SUTTCLIFFE,R.G. (1972)
Alpha-feto protein in the antenatal diagnosis of anencephaly
and spina bifida. Lancet, 2, 197.
16. CASTLE,W.B., DALAND,G.A. (1937)
Susceptibility of mammalian erythrocytes to hemolysis with
hypotonic solutions. Arch.Int.Med. 60, 949.
17. CHALMERS,R.A, HUBBARD,A.R., SPRANDEL,U. (1981)
Characteristics of erythrocyte ghosts prepared by dielectric
breakdown. Clin.sci 60, 2.
18. CHANG,T.M. (1972)
Artificial cells. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
19. CHANG,T.M. (1975)
Immobilized enzymes and biomedical applications. In: Immobi-
lized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides. (WEETALL,
H. ed.)M.Dekker, N.Y., 245.
20. CHAPMAN,S.J., ALLISON,J.V., GRIMES,A.J. (1971)
Factors affecting the autohemolysis of normal human red cells
and the mechanism of lysis in vitro. Scand.J.Haematol. 8,347.
21. COLDMAN,M.F., GENT,M., GOOD,W. (1969)
The osmotic fragility of mammalian erythrocytes in hypotonic
solutions of sodium chloride. Comp.Biochem.Physiol. 31, 605.
22. CONWAY,E.J. & COOKE,R. (1937)
Ammonia formation in shed blood and a characteristic deamin-
ase of the lood stream. Nature 139, 627.
23. COOPER,R.A., SHATTIL,S.J. (1971)
Mechanisms of hemolysis - the minimal red cell defect. New
England Journal of Medicine 27, 1514.
24. COSTA,F.F., ZAGO,M.A., BOTTURA,C. (1981)
An alternative decompementation method for the measurement
of the survival of human erythrocytes transfused into rats.
Experientia 37, 437.

25. DALE, G.L., VILLACORTE, D.G., BEUTLER, E. (1977)
High-yield entrapment of proteins into erythrocytes.
Biochemical Medicine 18, 220.
26. DANON, D., NEVO, A., MARIKOVSKY, Y. (1954)
Preparation of erythrocyte ghosts by gradual hemolysis in
hypotonic aqueous solution. Bull. Res. Council Israel 6 E, 36.
27. DELOACH, J.R., IHLER, G.M. (1977)
A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes
and lipids. Biochem. Biophys. Acta 496, 136.
28. DELOACH, J.R., PETERS, S., PINKARD, O., IHLER, G.M. (1977)
Effect of Glutaraldehyde treatment on enzyme loaded erythro-
cytes. Biochim. Biophys. Acta 496, 507.
29. DELOACH, J.R., HARRIS, R.L., IHLER, G.M. (1980)
An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large
quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a
pesticide in erythrocyte ghosts. Anal. Biochem. 102, 220.
30. DELOACH, J.R., BARTON, C., CULLER, K. (1981)
Preparation of resealed erythrocytes and in vivo survival in
dogs, Am. J. Vet. Res. 42(4), 664.
31. DELOACH, J.R., BARTON, C. (1981)
Glutaraldehyde treated carrier erythrocytes for organ
targeting of Methotrexate in dogs. In Press
32. DESNICK, R.J., FIDDLER, M.B. (1976)
Advances in the treatment of genetic diseases: an overview.
In: Birth defects; risks and consequences (KELLY, S. et al.,
eds.) Academic press, New York, 329
33. DESNICK, R.J., THORPE, S.R., FIDDLER, M.B. (1976)
Towards enzyme therapy for lysosomal storage diseases.
Physiol. Rev. 56, 57.
34. DESNICK, R.J., FIDDLER, M.B., DOUGLAS, S., HUDSON, L. (1978)
Enzyme therapy XI: Immunologic considerations for replacement
therapy with untrapped, erythrocyte- and liposome-entrapped
enzymes. Advances in Experimental Medicine and Biology. 101,
753.
35. DOURMASHKIN, R.R., ROSSE, W.F. (1966)
Morphologic changes in the membranes of red blood cells
undergoing hemolysis. Am. J. Med. 41, 699.
36. FIDDLER, M.B., HUDSON, L.D., DESNICK, R.J. (1977)
Immunological evaluation of repeated administration of
erythrocyte-entrapped protein to C3H/HeJ mice. Biochem. J.
168, 141.
37. FIDDLER, M.B., THORPE, S.R., KRIVIT, R., DESNICK, R.J. (1974)
In vivo fate of erythrocyte entrapped β -Glucuronidase. In:
Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases (TAGER, J.M. et
al. Eds.), North Holland Publishing, Amsterdam, 182.

38. FRIEDMAN, J.J. (1955)
Organ plasma volume of normal unanesthetized mice.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 88, 323
39. FRIEDMAN, J.J. (1959)
Circulating and tissue hematocrits of normal anesthetized mice. Amer.J.Physiol. 196, 420
40. GIAVEDONI, E.B., MASON, R.P., DALMASSO, A.P. (1978)
Studies with resealed and glutaraldehyde-treated erythrocyte membrane ghosts. Journal of Immunology, Vol.120, Nr.6, 2003
41. GABRIO, B.W., DONOHUE, D.M. & FINCH, C.A. (1955)
Erythrocyte preservation. V. Relationship between changes and viability of stored blood treated with adenosine. J.clin. Invest. 34, 1509.
42. GOLDEN G., SHIELDS, R. (1971)
The maintenance of pH in stored blood. J.Med. 2, 395.
43. GREGORIADIS, G., RYMAN, B.E. (1973)
Fate of protein-containing liposomes injected into rats: an approach to the treatment of storage diseases. Eur.J.Biochem. 24, 485.
44. GREGORIADIS, G. (1979)
Drug Carriers in Biology and Medicine, VII. Energy metabolism in erythrocytes and erythrocyte ghosts. Academic Press, London, New York, 138.
45. GRIMES, A.J. (1980)
Human Red Cell Metabolism. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, 279.
46. GUEST, G.M. (1948)
Osmometric behavior of normal and abnormal erythrocytes. Blood 3, 541.
47. HAGEMANN E. (1960)
Ratte und Maus. De Gruyter, Berlin
48. HARADIN, A.R., WEED, R.I., REED, C.F. (1969)
Changes in physical properties of stored erythrocytes. Relationship to survival in vivo. Transfusion: 9, No 5, 229.
49. HARRIS, I.M., McALISTER, J.M., PRANKERD, T.A. (1957)
The relationship of abnormal red cells to the normal spleen. Clin.Sc. 16, 223.
50. HOFFMAN, J.F., EDEN, M., BARR, J.S., & BEDELL, R.H.S (1958)
Hemolytic volume of human erythrocytes. J.Cell.Comp.Physiol. 51, 405.
51. HOFFMAN, J.F. (1958)
The physiological characteristics of human red blood cell ghosts. J.gen. Physiol. 42, 9.

52. HAM, T.H., CASTLE, W.B. (1940)
Studies on destruction of red blood cells. Proc. Am. Philos. Soc. 82, 411.
53. HUBBARD, R.A., SPRANDEL, U., CHALMERS, R.A. (1981 a)
Organic acid transport in resealed hemoglobin-containing human erythrocyte "ghosts". Biochem. J. 190, 653.
54. HUBBARD, R.A., SPRANDEL, U., CHALMERS, R.A. (1981 b)
Dependence of mouse erythrocyte "ghosts" survival in vivo on cellular ATP concentrations. Biochem. Soc. Trans. 8, 578.
55. HUDSON, L., FIDDLER, M.B., DESNICK, R.J. (1979)
Enzyme therapy X: Immune response induced by enzyme- and buffer-loaded liposomes in C3H/HeJ mice. J. Pharm. Exp. Ther. 3, 507.
56. IHLER, G.M., GLEW, R.H., SCHNUR, F.W. (1973)
Enzyme loading of erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2663.
57. KALISS, N. & PRESSMAN, O. (1950)
Plasma and blood volumes of mouse organs, as determined with radioactive iodoproteins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75, 16.
58. KATCHALSKY, A., KEDEM, O., KLIBANSKY, C., DeVRIES, A. (1960)
Rheological considerations of the hemolysing red blood cell. In A.L. Copley, ed. G. Stainsby, Flow Properties of Blood and Other Biological Systems, Pergamon Press, New York, 155.
59. KWANT, W.O., SEEMAN, P. (1970)
The erythrocyte is a perfect osmometer. J. Gen. Physiol. 55, 208.
60. LANE-PETTER, W. (1963)
Animals for Research, Academic Press, London
61. LÖRCHER, H. (1981)
Persönliche Mitteilungen
62. MITRUKA, B.M., RAWNSLEY, H.M., DHARAM, V.V. (1976)
Animals for medical research. Wiley Medical Publications, New York
63. MURPHY, J.R. (1967)
The influence of pH and temperature on some physical properties of normal erythrocytes and erythrocytes from patients with hereditary spherocytosis. J. Lab. Clin. Med. 69, 758.
64. NAKAO, K., WADA, T., KAMIYA, T., NAKAO, M. & NAGANO, K. (1962)
A direct relationship between adenosine triphosphate level and in vivo viability of erythrocytes. Nature 194, 877.
65. NAKAO, M., NAKAO, T., ARIMATSU, Y. & YOSHIKAWA, H. (1960 a)
A new preservation medium maintaining the level of adenosine triphosphate and the osmotic resistance of erythrocyte. Proc. Jpn. Acta. 36, 43.

66. NAKAO, M., NAKAO, T., TATIBANA, M. & YOSHIKAWA, H. (1960 b)
Shape transformation of erythrocytic ghosts on addition of
adenosine triphosphate in longstored erythrocyte by incubation
with inosine and adenosine. *J. Biochem.* 47, 661.
67. PENNISTON, J.T., GREEN, D.E. (1968)
Energized states and pinocytosis in erythrocyte ghosts.
Archives of Biochemistry and Biophysics 128, 339.
68. PENNISTON, J.T., VAUGHAN, L., NAKAMURA, M. (1979)
Endocytosis in erythrocytes and ghosts: occurrence at 0 degree
Celsius after ATP preincubation. *Archives of Biochemistry and
Biophysics* 2, 339.
69. PONDER, E. (1948)
Haemolysis and Related Phenomena. Churchill, London. S.31 und
131.
70. PRANKERED, T.A.J. (1958)
The ageing of red cells. *J. Physiol.* 143, 325.
71. RUMMEL, W., SEIFFEN, E. (1964)
Narkose, Injektion und Blutentnahme bei Versuchstieren. In:
Biochemisches Taschenbuch. 2. Teil, 2. Aufl. Springer Verlag
Berlin
72. SAARI, J.T., BECK, J.S. (1975)
Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase
process. *J. Membrane Biol.* 23, 213.
73. SEGAL, A.W., GREGORIADIS, G., BLACK, C.D. (1975)
Liposomes as vehicles for the local release of drugs. *Clin.
Sci. Molec. Med.* 49, 99.
74. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1979)
Transport of uric acid and L-phenylalanine by resealed erythrocyte
ghosts prepared by dialysis technique. *Biochem. Soc. Trans.* 7, 958.
75. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1979 a)
In vitro studies on resealed erythrocyte ghosts as protein
carriers. *Res. Exp. Med.* 175.
76. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1979 b)
Membrane transport in resealed haemoglobin-containing human
erythrocyte ghosts prepared by a dialysis procedure. *Biochem.
Biophys. Res. Commun.* 91, 79.
77. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1980)
Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes. In *Clinical
Research Centre Report*, Medical Research Council, London
1980, 147.
78. SPRANDEL, U., CHALMERS, R.A. (1980 a)
Morphologie von Erythrocytenschatten als in vivo Trägersysteme.
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 86, 1090.

79. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1980 b)
In vivo life-span of resealed rabbit erythrocytes. Res.Exp.
Med. (Berlin) 177, 13.
80. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1980 c)
Survival of "carrier erythrocytes" in dogs. Clin. Sci. 59, 7.
91. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1981)
Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes. J.Inher.
Metabol. 12.
92. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1981 a)
In vivo Überlebenszeit von Erythrocytenschatten als Träger-
systeme für Pharmaka. Verh.Dt.Ges.Inn.Med. 87
93. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1981 b)
Species-specific characteristics of resealed erythrocyte
ghosts in vitro. Biochem.Soc.Trans. 8, 536.
94. SPRANDEL, U., CLARK, J., CHALMERS, R.A., HUBBARD, A. (1981 d)
Morphology of haemoglobin-containing human erythrocyte
ghosts. Micron 12, 29.
95. SPRANDEL, U., SCHROT, W., ZÖLLNER, N. (1981 e)
Targeting carrier erythrocytes to the liver, an approach to
enzyme replacement therapy. In Press
96. SPRANDEL, U., STARK, F., ZÖLLNER, N. (1981 f)
In vitro studies towards enzyme replacement therapy using
carrier erythrocytes. In Press
97. STANBURY, J.B. (ED.) (1978)
The metabolic basis of inherited diseases. Blakiston publi-
cations, New York
98. STARK, F. (1981)
Glucoseaufnahme, Adenosintriphosphat und osmotische Resistenz
von Trägererythrozyten. Inaugural-Dissertation, München.
99. STAROS, J.V., HALEY, B.E., RICHARDS, F.M. (1974)
Human erythrocytes and resealed ghosts. Journal of Biological
Chemistry, Vol. 249, No. 15, 5004.
100. STRUCK, H.J. (1973)
Experimentelle Medizin. Thieme Verlag Stuttgart
101. SÜDDEUTSCHE VERSUCHSTIERFARM (1981)
Mitteilungsblätter. Tuttlingen
102. THORPE, S.R., FIDDLER, M.B., DESNICK, R.J. (1975)
Enzyme therapy. V. In vivo fate of erythrocyte-entrapped β -
Glucuronidase in β -Glucuronidase-deficient mice. Pediat.Res.
9, 918.
103. TYRRELL, D.A., RYMAN, B.E. (1976)
The entrapment of therapeutic agents in resealed erythrocyte
ghosts and their fate in vivo. Biochem.Soc.Trans. 4, 677

104. UPDIKE, S.J., WAKAMIYA, R.T., LIGHTFOOT, E.N. (1976)
Asparaginase entrapped in red blood cells. *Science* 193, 681.
105. WESTHUES, M., FRITSCH, R. (1961)
Die Narkose der Tiere. Bd.I: Lokalanästhesie, Bd.II:
Allgemeinnarkose. Parcy, Berlin
106. WHITAKER, T.R., SARTIANO, G., HAMELLE, L.J., GLEW, R. (1974)
Hypotonic exchange loading of human erythrocytes with ⁵⁹-Fe
labeled rabbit hemoglobin. *J.Lab.Clin.Med.* 84, 879
107. WHITTAM, R. & WHEELER, K.P. (1970)
Transport across cell membranes. *Annu.Rev.Physiol.* 32, 21.
108. WIDDER, K.J., SENYEI, A., RANNEY, D.F. (1979)
Magnetically responsive microspheres and other carriers for
the biophysical targeting of antitumor agents. *Advances in
Pharmacology and Chemotherapy* 16, 213.
109. WISH, L., FURTH, J., STOREY, R.H. (1950)
Direct determinations of plasma, cell, and organ-blood volume
in normal and hypervolemic mice. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 74,
644
109. YEE, J.P., HOWARD, C.M. (1978)
Dynamic osmotic hemolysis of human erythrocytes and repair of
Ghosts, as studied by resistive pulse spectroscopy.
Biorheology, 14, 321
110. YOUNG, L.E. (1955)
Hereditary spherocytosis. *Am.J.Med.* 18, 486.
111. ZADE-OPPEN, A.M.M., ØSTLING, S.G., MARSDEN, N. (1979)
On how macromolecules reduce hemoglobin loss in hypotonic
hemolysis. *Upsala J.Med.Sci.* 84, 155.
112. ZENTRALINSTITUT FÜR VERSUCHSTIERE (1981)
Mitteilungsblätter. Hannover
113. ZIMMERMANN, U., PILWAT, G., RIEMANN, F. (1974)
Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys.J.* 14, 881
114. ZIMMERMANN, U., HOLZAPFEL, C., ROSENHECK, K. (1976)
Electrical hemolysis of human and bovine red blood cells. *J.
Membrane.Biol.* 30, 135.
115. ZIMMERMANN, U., RIEMANN, F., PILWAT, G. (1976)
Enzyme loading of electrically homogenous human red cell
ghosts prepared by dielectric breakdown. *Biochem. Biophys.
Acta* 436, 460.
116. ZIMMERMANN, U., PILWAT, G., ESSER, B. (1978)
The effect of encapsulation in red blood cells on the
distribution of Methotrexate in mice. *J.Clin.Chem.Clin.
Biochem.* 16, 135.

Herrn Professor Dr. N. Zöllner danke ich für die Überlassung des Themas. Herrn Dr. U. Sprandel sei für seine stetigen Bemühungen gedankt, die wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beitrugen.

LEBENS LAUF

Wilhelm S C H R O T, geboren am 6. Juli 1954 in Wittlich als Sohn des Schlossermeisters Wilhelm Schrot und seiner Ehefrau Gisela, geb. Gödert.

1961 - 1965 Volksschule Wittlich

1965 - 1973 Staatliches Cusanus Gymnasium Wittlich

1973 Abitur am Cusanus Gymnasium Wittlich

1973 - 1980 Studium der Humanmedizin:

1973 - 1975 Faculté de Medicine de l'Université de Liège
(Lüttich, Belgien)

1975 - 1977 Medizinische Fakultät der Universität Würzburg

1977 - 1980 Medizinische Fakultät der Universität Köln

Juni 1980 Approbation als Arzt

Juli 1980 - Assistenzarzt am Pathologischen Institut Gelsen-

Juni 1981 kirchen (Leitung Prof. Dr. Mohr)

